A.1 ERİME/DONMA SICAKLIĞI

1. YÖNTEM

Burada bahsedilen yöntemlerin büyük çoğunluğu OECD Test Dokümanına dayanarak tanımlanmıştır (1). Temel ilkeler kaynak (2) ve (3)'te verilmiştir.

1.1. Giriş

Tanımlanan yöntem ve cihazlar,saflık dereceleriyle ilgili herhangi bir sınırlama olmaksızın maddelerin erime sıcaklığını belirlemek için kullanılır.

Yöntemin seçimi, test edilecek maddenin içeriğine bağlıdır. Sonuç olarak sınırlayıcı faktör, maddenin kolayca, zor ya da hiç toz haline gelmiyor olmasına bağlı olacaktır.

Bazı maddeler için donma veya katılaşma sıcaklığını belirlemek çok daha uygundur ve bu tayinlere ilişkin standartlar, yöntemin içinde ayrıca bulunmaktadır.

Ancak maddenin kendine has özelliklerine bağlı olarak, yukarıdaki parametrelerin hiçbiri uygun şekilde ölçülemediği durumda akma noktası tayini uygun olabilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Erime sıcaklığı, atmosferik basınç altında katı halden sıvı hale faz geçişinin olduğu sıcaklık olarak tanımlanır ve bu sıcaklık ideal olarak donma sıcaklığına karşılık gelir.

Pek çok maddenin faz geçişi, erime aralığı olarak tanımlanan sıcaklık aralığının üzerinde gerçekleşir.

Birimlerin çevrimi (K 'den °C'ye)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius sıcaklığı, derece Celcius (°C)

T: Termodinamik sıcaklık, Kelvin (K)

1.3. Referans maddeler

Yeni bir maddenin incelendiği her durumda referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Yöntemin performansını zaman zaman kontrol etmek amacıyla kullanılırlar ve diğer yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarlar.

Bazı kalibrasyon maddeleri kaynaklarda (4) listelenmiştir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Katı halden sıvı hale ya da sıvı halden katı hale faz geçiş sıcaklığı (sıcaklık aralığı) belirlenir. Pratikte, test maddesi örneğini atmosfer basıncında ısıtırken veya soğuturken başlangıç ve sonuç durumundaki erime/donma sıcaklıkları belirlenir. Kılcal yöntem, sıcak hal yöntemi, donma sıcaklığı

belirlemeleri, termal analiz yöntemleri ve petrol yağları için geliştirilen akma noktası yöntemi olarak adlandırılan beş farklı yöntem tanımlanmıştır.

Bazı durumlarda erime noktası yerine donma noktasının ölçülmesi daha sağlıklı olabilir.

1.4.1. Kılcal yöntem

1.4.1.1. Sıvı banyolu erime sıcaklığı cihazı

İnceltilerek toz haline getirilmiş az miktarda madde, kılcalcam tüpünün içineyerleştirilerek sıkıca kapatılır. Tüp, termometreyle birlikte ısıtılır ve gerçek erime esnasında sıcaklık artışı 1K/dak. 'dan az olacak şekilde ayarlanır. Başlangıç ve sonuç durumundaki erime sıcaklıkları belirlenir.

1.4.1.2. Metal bloklu erime sıcaklığı cihazı

Kapiler tüp ve termometrenin, ısıtılmış metal bloğun içinde olması haricinde 1.4.1.1.'de tarif edildiği gibi uygulanır ve bloktaki deliklerden gözlem yapılabilir.

1.4.1.3. Fotoselle tayin

Kapiler tüp içindeki örnek, metal bir silindirin içinde otomatik olarak ısıtılır. Silindirdeki delikler sayesinde madde üzerinden geçen ışık demeti hassas kalibre edilmiş fotosele gönderilir. Erime esnasında çoğu maddenin optik özelliği opaktan saydama değişir. Fotosele ulaşan ışığın yoğunluğu artar ve ısıtma odacığındaki platin rezistanslı termometrenin sıcaklığını okuyan sayısal alıcıya 'dur' sinyali gönderir. Bu yöntem koyu renkli maddeler için uygun değildir.

1.4.2. Sıcak evreler

1.4.2.1. Kofler sıcak çubuğu

Kofler sıcak çubuğu, farklı ısı iletkenliği olan, elektrikle ısınan ve uzunluğu boyunca sıcaklık değişimi hemen hemen doğrusal olacak şekilde tasarlanan 2 metal parçadan oluşur. Sıcak çubuğun sıcaklığı 283-573 K arasında değişir. Göstergeli bir rayı (runner) ve herbir çubuk için tasarlanan şeridi bulunan özel bir sıcaklık okuma cihazında erime sıcaklığını belirlemek için, madde, ince bir tabaka halinde doğrudan sıcak çubuğun üzerine yayılır. Birkaç saniye içinde sıvı ve katı faz arasında keskin bir ayrım çizgisi oluşur. Ayrım çizgisindeki sıcaklık, göstergeyi çizgi üzerinde olacak durumda ayarlayarak okunur.

1.4.2.2. Erime mikroskobu

Pek çok mikroskop sıcak evreleri, maddenin çok az bir miktarıyla, erime sıcaklığının belirlenmesinde kullanılır. Sıcak evrelerin çoğunda sıcaklık ölçümü hassas termokapillerle yapılır, fakat bazen civalı termometreler de kullanılır. Tipik bir mikroskop sıcak evre erime sıcaklığı düzeneğinde, lam'ın üzerinde örneğin yerleştirildiği metal plaka içeren ısıtma odacığı yer almaktadır. Metal plakanın merkezinde mikroskobun aydınlatıcı aynasından ışığın geçişine izin veren bir delik bulunur. Kullanım esnasında ise numunenin hava almaması için, odacık cam bir plakayla kapatılır.

Numunenin ısıtılması,sürgülü direnç (reosta) ile ayarlanır. Optik olarak izotropik (eş yönlü) olmayan maddelerin çok hassas ölçümlerinde, polarize ışık kullanılabilir.

1.4.2.3. Menisküs yöntemi

Bu yöntem özel olarak poliamidler için kullanılır.

Sıcak evre ve poliamid test örneği destekli cam-kapak arasına konan silikon yağı menisküsünün yerdeğiştirdiği sıcaklık, görsel araçlar kullanılarak belirlenir.

1.4.3. Donma sıcaklığını tayinyöntemi

Örnek, özel bir test tüpüne daha sonra da bir düzeneğe donma noktasının belirlenmesi için yerleştirilir. Örnek soğurken sürekli ve yavaşça karıştırılır ve uygun aralıklarda sıcaklık ölçülür. Sıcaklık sabitleşir sabitleşmez (termometre hatasını düzeltmek için)birkaç okuma yapılır ve sabitleşen değer donma noktası olarak kaydedilir.

Katı ve sıvı fazlar dengede tutularak süper soğutmaönlenmelidir.

1.4.4. Termal analiz

1.4.4.1. Türevsel termal analiz (DTA)

Bu teknik, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, madde ve referans madde arasındaki sıcaklık farklarını kaydeder. Madde ve referans madde aynı kontrollü sıcaklık programına tabiidirler. Numunede entalpi değişikliğini içeren geçişler söz konusu olduğunda, bu değişiklik sıcaklık değerlerinin taban çizgisinden endotermik (erime) veya ekzotermik (donma) sapma olarak belirlenir.

1.4.4.2. Türevsel tarama kalorimetresi (DSC)

Bu teknik, madde ve referans maddeye aynı kontrollü sıcaklık programı uygulandığında sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, maddeye ve referans maddeye enerji girdilerinin farkını kaydeder. Bu enerji, madde ve referans madde arasındaki sıfır sıcaklık farkını oluşturmak için gerekli enerjidir.Numunede entalpi değişikliği gibi geçişler söz konusu olduğunda, bu değişiklik ısı akışı değerlerinin taban çizgisinden endotermik (erime) veya ekzotermik (donma) sapmalar olarak belirlenir.

1.4.5. Akma noktası

Bu yöntem petrol yağları için geliştirilmiştir ve düşük erime sıcaklığına sahip yağlı maddeler için uygundur.

Ön ısıtma işleminden sonra, örnek, belli bir hızda soğutulur ve akış özellikleri için 3K'lık aralıklara bakılır. Maddenin hareketinin gözlendiği en düşük sıcaklık akma noktası olarak kaydedilir.

1.5. Kalite kriterleri

Erime sıcaklığı/erime aralığının belirlenmesinde kullanılan farklı yöntemlerin uygulanabilirliği ve doğruluğu aşağıdaki tabloda listelenmiştir.

TABLO: YÖNTEMLERİN UYGULANABİLİRLİĞİ

A.Kapiler Yöntemler

Ölçüm yöntemi	Toz haline gelebilen maddeler	Kolayca toz haline gelmeyen maddeler	Sıcaklık aralığı	Tahmini doğruluk[1]	Geçerli standardlar
Sıvı banyolu erime sıcaklığı Cihazı	Evet	Birkaç tane	273-573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Metal bloklu erime sıcaklığı	Evet	Birkaç tane	293->573K	± 0,5 K	TS EN ISO 3146
Fotoselle tayin	Evet	Uygulama cihazları ile birlikte birkaç tane	253-573 K	± 0,5 K	

[1] Kullanılan aletin türüne ve maddenin saflığına bağlıdır

B.Sıcak evreler ve donma yöntemleri

Ölçümyöntemi	Toz haline gelebilen maddeler	Kolayca toz haline gelmeyen maddeler	Sıcaklık aralığı	Tahmini doğruluk[1]	Geçerli standardlar
Kofler Sıcak Çubuğu	Evet	Hayır	283->573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Erime Mikroskobu	Evet	Sadece birkaç	273->573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Menisküs yöntemi	Hayır	Özellikle poliamidler için	293->573 K	± 0,5 K	TS EN ISO 3146
Donma sıcaklığı	Evet	Evet	223-573 K	± 0,5 K	BS 4695 gibi

[1] Kullanılan aletin türüne ve maddenin saflığına bağlıdır

C.Termal Analiz

Ölçümyöntemi	Toz haline gelebilen maddeler	Kolayca toz haline gelmeyen maddeler	Sıcaklık aralığı	Tahmini doğruluk[1]	Geçerli standardlar
Diferansiyel Termal Analiz	Evet	Evet	173-1273 K	600K'e kadar ±0,5K 1273'e kadar± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferansiyel Tarama Kalorimetresi	Evet	Evet	173-1273 K	600K'e kadar ±0,5K 1273'e kadar ± 2,0 K	ASTM E 537-76
[1] Kullanılan aletin türüne ve maddenin saflığına bağlıdır					

D.Akma Noktası

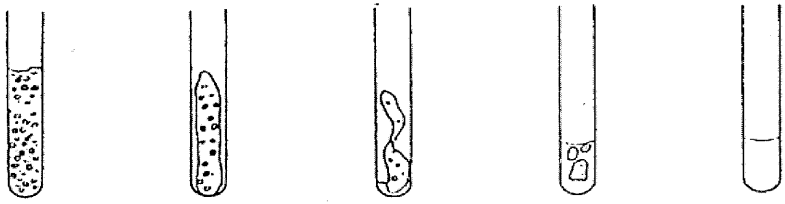
Ölçüm yöntemi	Toz haline gelebilen maddeler	Kolayca toz haline gelmeyen maddeler	Sıcaklık aralığı	Tahmini doğruluk[1]	Geçerli standardlar
Akma Noktası	Petrol yağları ve yağlı maddeler için	Petrol yağları ve yağlı maddeler için	223-323 K	±0,3 K	ASTM D 97-66
[1] Kullanılan aletin türüne ve maddenin saflığına bağlıdır					

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Neredeyse bütün test yöntemleri ulusal ve uluslararası standardlar çerçevesinde tanımlanmıştır. (Bkz. Ek-I)

1.6.1. Kılcal Borulu (Kapiler) Yöntemler

Sıcaklık artışının az olduğu durumlarda, ezilip toz haline getirilmiş maddeler genellikle şekil 1'de gösterildiği erime safhaları gösterirler



Safha A Safha B Safha C Safha D Safha E

Şekil 1

Safha A: (Erimenin başlangıcı): İnce damlalar düzgün bir şekilde kapiler tüpün iç çeperlerine yapışırlar.

Safha B: Eriyiğin büzülmesine bağlı olarak iç çeperler ve örnek arasında boşluklar belirir.

Safha C: İyice büzüşmüş olan örnek aşağıya doğru yığılmaya ve sıvılaşmaya başlar.

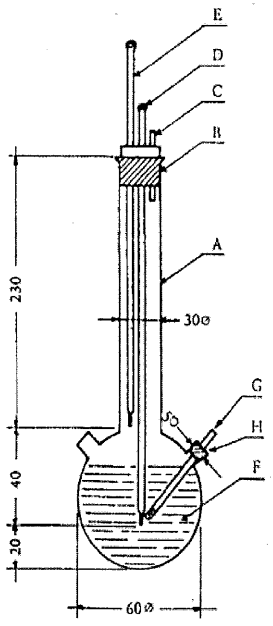
Safha D: Yüzeyde tamamlanmış bir menüsküs oluşur ancak örneğin kayda değer bir kısmı katı durumda kalır.

Safha E: (Erimenin son aşaması) Hiç katı parçacık yoktur.

Erime sıcaklığının belirlenmesi sırasında, erimenin başlangıcından son safhasına kadar tüm sıcaklıklar kaydedilir.

1.6.1.1. Sıvı banyosu düzenekli erime noktası cihazları

Şekil 2'de camdan yapılmış (JIS K 0064) bir çeşit Standartlaştırılmışerime sıcaklığı düzeneği görülmektedir. Bütün tanımlamalar milimetre cinsinden verilmiştir.



A: Ölçüm kabı
B: Tıpa
C: Havalandırma tüpü
D: Termometre
E: Yardımcı termometre
F: Banyo sıvısı
G: Dış çapı en fazla 5 mm olan , 80-100 mm uzunlukta 1,0 ± 0,2 mm iç çapta olan ve kalınlığı yaklaşık 0,2 ile 0,3 mm arasında camdan yapılmış kapiler bir tüp
H: Kenar tüpü

Şekil 2

Banyo sıvısı:

Uygun bir sıvı seçilmelidir. Sıvı seçimi, belirlenecek olan erime sıcaklığına bağlıdır. Örneğin, 473 K'den daha az olan erime sıcaklıkları için sıvı parafin, 573 K'den daha az olan erime sıcaklıkları için silikon yağı kullanılmaktadır.

Erime sıcaklığının 523 K'dan yüksek olduğu durumlarda, üç birim sülfirik asit ve iki birim potasyum sülfat (kütle oranında) içeren bir karışım kullanılabilir. Bu gibi çözeltilerin kullanıldığı durumlarda uygun önlemler alınmak zorundadır.

Termometre:

Sadece aşağıdaki standart veya ona eşdeğer standartların gereğini yerine getirebilecek termometreler kullanılmalıdır.

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

İşlem:

Kuru madde, havanın içinde ufalanarak toz haline getirilir ve bir tarafı kapalı olan kılcal tüpün içerisinedoldurma seviyesi yaklaşık 3 mm olacak şekilde sıkıştırılarak yerleştirilir.. Düzenli yerleştirebilmek için kapiler tüpün, saat camının üzerine dikey olarak yerleştirilmiş bir cam tüp boyunca, yaklaşık 700 mm'den bırakılması gerekir.

Doldurulmuş kılcal tüp banyonun içine yerleştirilir böylece termometrenin civa baloncuğunun orta kısmı kılcal tüpte örneğin bulunduğu yere değer.Kılcal tüp genellikle erime sıcaklığının 10 K altında düzeneğe yerleştirilir.

Sıcaklık artışı yaklaşık 3 K/dak. olacak şekilde banyo sıvısı ısıtılır. Sıvı karıştırılmalıdır. Beklenen erime sıcaklığının 10 K kadar altında sıcaklık artış hızı en fazla 1 K/dak. olacak şekilde ayarlanmalıdır.

Hesaplama:

Erime sıcaklığı hesaplaması aşağıdaki gibidir:

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

Burada:

T = Kelvin cinsinden düzeltilmiş erime sıcaklığı

T_D=D termometresindeki sıcaklığın Kelvin cinsinden değeri

T_E =E termometresindeki sıcaklığın Kelvin cinsinden değeri

n = Aniden ortaya çıkan durumlarda D termometresi üzerindeki cıva derecelerinin sayısı

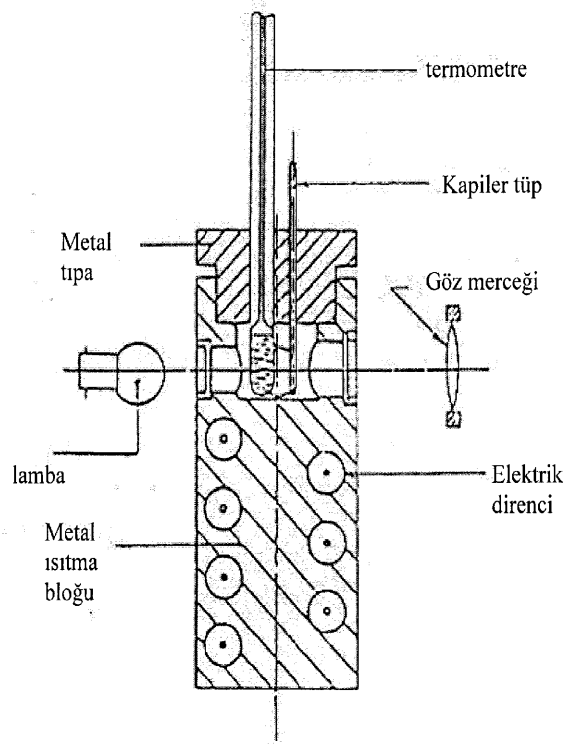
1.6.1.2. Metal bloklu erime sıcaklığı cihazları

Düzenek:

- üst kısmı oyuk olan ve bir odacık oluşturan silindirik metal blok (bknz. Şekil 3),
- iki ya da daha fazla deliği olan, boruların metal bloğa bağlanmasını sağlayan metal tıpa,
- metal blok için ısıtma sistemi, örneğin bloğun içinde bir elektrik resistansı sağlayacak şekilde
- elektrikli ısıtma sistemi kullanılacaksa, güç girişi ayarlamak için sürgülü direnç (reosta)
- odacığın yan duvarlarında birbirlerine dik açılarla bakanısıya dayanıklı dört pencere. Bu pencerelerden birinin önüne kılcal tüpü gözleyebilmek için yerleştirilen göz deliği. Diğer 3 pencere içerinin içerinin lambalar yardımı ile aydınlatılması için kullanılır.
- ısıya dayanıklı, tek tarafı kapalı, camdan kılcal tüp (bknz 1.6.1.1) kısımlarını içermektedir.

Termometre:

1.6.1.1'de belirtilen standartlara bakınız. Ayrıca karşılaştırılabilir doğruluğa sahip termoelektrik ölçüm cihazları da kullanılabilir.



Şekil 3

1.6.1.3. Fotoselle tayin

Düzenek ve işlem:

Düzenek, otomatik ısıtma sistemli metal bir odacıktan meydana gelir. 3 kapiler 1.6.1.1'e göre doldurulur ve etüve yerleştirilir.

Düzeneğin ayarlanması için çeşitli lineer sıcaklık artışları mevcuttur ve uygun sıcaklık artışı daha önceden seçilen sabit ve lineer bir hıza elektriksel olarak ayarlanır. Kaydediciler etüvün mevcut sıcaklığını ve kapiler tüpteki maddenin sıcaklığını gösterir.

1.6.2. Sıcak evreler

1.6.2.1. Kofler sıcak çubuğu

Ek-I'e bakınız.

1.6.2.2. Erime mikroskobu

Ek-I'e bakınız

1.6.2.3. Menisküs yöntemi (Poliamidler)

Ek-I'e bakınız.

Isıtma hızı erime sıcaklığı boyunca, 1 K/dak. 'dan daha az olmalıdır.

1.6.3. Donma sıcaklığının belirlenmesi için yöntemler

Ek-I'e bakınız.

1.6.4. Termal analiz

1.6.4.1. Türevsel termal analiz

Ek-I'e bakınız.

1.6.4.2. Türevsel tarama kalorimetresi

Ek-I'e bakınız.

1.6.5. Akma noktasının belirlenmesi

Ek-I'e bakınız.

2. VERİLER

Bazı durumlarda termometrenin düzeltilmesi gerekebilir.

Bazı durumlarda termometrenin düzeltilmesi gerekebilir.

3. RAPORLAMA

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan yöntem
- maddenin tam olarak özellikleri (tanımı ve safsızlıkları), varsa başlangıç saflaştırma basamağı
- tahmini doğruluk

Tahmin edilen doğruluk aralığında olan en az iki ölçümün ortalaması (tablolara bakınız) erime sıcaklığı olarak rapor edilir.

Erimenin başladığı andaki ve son safhasındaki sıcaklıkları arasındaki fark yöntemin kesinlik sınırları içindeyse, erimenin son safhasındaki sıcaklık erime sıcaklığı olarak alınır; aksi takdirde her 2 sıcaklık da rapor edilir.

Madde erime sıcaklığına ulaşmadan bozunur veya süblimleşirse, etkinin gözlendiği sıcaklık rapor edilmelidir.

Sonuçların yorumlanması için ilgili bütün bilgilerin ve hatırlatmaların, özellikle de maddenin safsızlığı ve fiziksel haline bağlı olanların, rapor edilmesi gerekir.

4. KAYNAKLAR

(1) (1), Paris OECD, 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, 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
(5) laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

Ek-I

İlave teknik detaylar için örnek olarak aşağıdaki standartlardan yararlanılabilinir.

1. Kapiler yöntem

1.1. Sıvı banyolu erime sıcaklığı düzeneği

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points andthemelting 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 Kapilarverfarehn
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2 Metal bloklu erime sıcaklığı cihazı

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
TS EN ISO 3146	Plâstikler- Poliamitler- Yarı Kristal Polimerlerin Erime Özelliğinin, (Erime Sıcaklığı veya Erime Aralığınını) Tayini

2. Sıcak safhalar

2.1. Kofler sıcak çubuğu

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

2.2. Erimemikroskobu

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Menisküs yöntemi (Poliamidler)

TS EN ISO 3146	Plâstikler- Yarı Kristal Polimerlerin Erime Özelliğinin, (Erime Sıcaklığı veya Erime Aralığınını) Tayini
ANSI/ ASTM D 2133-66	Standard specification for
NF T 51-050	Resines de polyamides. Determination du 'point de fusion' Methode du menisque

3. Donma sıcaklığının tayini için yöntemler

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (CoolingCurve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoff Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
TS 4196 ISO 2207	Petrol Mumları – Akmama Noktası Tayini
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Methode de determination du point de cristallisation (point de congelation)
TS ISO 1392	Kristallenme noktası tayini – Genel yöntem

4. Termal analiz

4.1.Türevsel termal analiz

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 Ana!yse, Begriffe

4.2.Diferansiyel taramalı kalorimetri (türevsel taramalı kalorimetri)

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. Akma noktasının belirlenmesi

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de troubleet point d'ecoulement limite -Monsterneming en ontleding van aardolieproducten:Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
TS 1233 ISO 3016	Petrol Ürünleri - Akma Noktası Tayini.

A.2. KAYNAMA SICAKLIĞI

1. YÖNTEM

Açıklanan yöntemlerin büyük çoğunluğu OECD'nin test dokümanına (1) dayanır. Temel prensipler (2) ve (3) no'lu kaynaklarda verilmiştir.

1.1. Giriş

Buradaki yöntemler ve cihazlar, sıvılara ve kaynama sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda kimyasal reaksiyona girmeyen (örneğin kendi kendine oksitlenmesi, yeniden düzenlenme, bozunma vs.) düşük sıcaklıklarda eriyen maddelere uygulanır. Yöntemler, saf ve saf olmayan sıvı maddelere uygulanabilir.

Termal analiz ve fotoselle tayin yapılan yöntemlere önem verilmektedir. Çünkü bu yöntemler kaynama sıcaklığı gibi erime sıcaklığının da saptanmasına izin verir. Daha önemlisi ölçümler otomatik olarak gerçekleştirilebilir.

'Dinamik yöntem'in aynı zamanda buhar basıncını da ölçebilmesi gibi bir avantajı vardır ve kaynama sıcaklığını normal basınçla (101,325 kPa) doğrulama gereksinimi yoktur çünkü ölçümler sırasında basınç bir manostat vasıtasıyla ayarlanabilir.

Açıklamalar:

Safsızlıkların kaynama sıcaklığının belirlenmesindeki etkisi rol daha çok safsızlığın doğası ile ilgilidir. Numunenin içerisinde test sonuçlarını etkileyebilecek olan uçucu safsızlıklar olduğu zaman madde saflaştırılabilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Bir sıvının normal kaynama sıcaklığı, buhar basıncı 101,325 kPA olduğunda ölçülen sıcaklık olarak tanımlanır.

Kaynama sıcaklığı normal atmosferik basınç altında ölçülmediyse, buhar basıncının sıcaklığa bağlılığı, Clausius-Clapeyron eşitliğiyle tanımlanabilir:

$$Logp = \frac{\Delta H_v}{2{,}3RT} + sabit$$

Burada:

p = maddenin pascal cinsinden buhar basıncı

ΔH_v = $Jmol^{-1}$ biriminde maddenin buharlaşama ısısı

R = evrensel molar gaz sabiti = 8,314 $Jmol^{-1}$ K^{-1}

T = K cinsinden termodinamik sıcaklık

Kaynama sıcaklığı ölçüm esnasındaki ortam basıncı dikkate alınarak belirtilir.

Çevrimler

Basınç (birimler: kPa)

100 kPA = 1 bar =0,1 Mpa
('bar' hala kullanılmaktadır ancak tavsiye edilmemektedir)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Tor
('mm Hg' ve 'Tor' birimlerin kullanılmasına izin verilmemektedir).

1 atm = standard atmosfer = 101 325 Pa
('atm' biriminin kullanılmasına izin verilmemektedir)

Sıcaklık (birimler: K)

$t = T - 273,15$

t: Celsius sıcaklığı, derece Celcius (°C)

T: Termodinamik sıcaklık, Kelvin (K)

1.3. Referans maddeler

Yeni bir maddenin incelendiği her durumda referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Yöntemin performansını (verimliliğini) zaman zaman kontrol etmek amacıyla kullanılırlar ve diğer yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarlar.

Bazı kalibrasyon maddeleri ekte listelenmiş yöntemlerde bulunabilir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Kaynama sıcaklığının (kaynama aralığı) tayini için kullanılan yöntemlerden beş tanesi kaynama sıcaklığının ölçümüne ve iki tanesi de termal analize dayanır.

1.4.1. Ebulliyometre ile tayin

Ebulliyometreler, orjinal olarak kaynama sıcaklığı yükselmelerinden molekül ağırlığı tayini için geliştirilmişlerdir. Bununla birlikte, bu cihazlar, kaynama sıcaklığının kesin belirlenmesinde kullanılmak içinde uygundur. ASTM D 1120-72'de (bakınız Ek-I) çok basit bir düzenek tarif edilmiştir. Sıvı, bu cihazın içerisinde atmosferik basınca eşdeğer koşullar altında kaynayana kadar ısıtılır.

1.4.2. Dinamik yöntem

Bu yöntem, kaynama sırasında geri akış sıvısının içine yerleştirilmiş uygun bir termometre vasıtasıyla buharın yoğunlaşma ısısının ölçümlerini içerir.

1.4.3. Kaynama sıcaklığı için damıtma metodu

Bu yöntem, sıvıların damıtılmasını, buhar yoğunlaşma ısısının ölçümü ve damıtılmış miktarın belirlenmesini içerir.

1.4.4. Siwoloboff yöntemi.

Örnek, ısı banyosuna yerleştirilen örnek tüpünde ısıtılır. Alt tarafında hava kabarcığı olan kapatılmış kapiler, örneğe daldırılır.

1.4.5. Fotoselle tayin

Swioloboff yöntemi takip edilerek, örnekten yukarı doğru çıkan kabarcıkları sayan otomatik foto-elektrik ölçüm yapılır.

1.4.6. Türevsel termal analiz

Bu teknik, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, madde ve referans madde arasındaki sıcaklık farklarını kaydeder. Madde ve referans madde aynı kontrollü sıcaklık programına tabidirler. Numunede entalpi değişikliği gibi geçişler söz konusu olduğunda, bu değişiklik sıcaklık değerlerinin taban çizgisinden endotermik sapma (kaynama) olarak belirlenir.

1.4.7. Diferansiyel tarama kalorimetresi

Bu teknik, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak, maddeye ve referans maddeye giren enerji farkını kaydeder. Madde ve referans madde aynı kontrollü sıcaklık programına tabiidirler. Bu enerji, madde ve referans madde arasındaki sıfır sıcaklık farkını oluşturmak için gerekli enerjidir. Numunede entalpi değişikliği gibi geçişler söz konusu olduğunda, bu değişiklik ısı akışı değerlerinin taban çizgisinden endotermik sapma (kaynama) olarak belirlenir.

1.5. Kalite kriterleri

Kaynama sıcaklığı/kaynama aralığının tayini için kullanılan farklı yöntemlerin uygulanabilirlik ve doğrulukları Tablo-1 de listelenmiştir.

TABLO 1: YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ölçüm yöntemi	Tahmin edilen doğruluğu	Mevcut standardı
Ebulliyometre	± 1,4 K (373 K kadar) [1] [2] ± 2,5 K (600 K kadar) [1] [2]	ASTM D 1120-72 ([1])
Dinamik yöntem	±0,5 K(600K kadar[2])	
Damıtma işlemi (kaynama aralığı)	±0,5K(600K kadar)	TS ISO 918, DIN 53171, BS4591/71
Siwoloboff göre	±2K(600K kadar) [2]	
Fotoselle tayin	±0,3K(373K kadar) [2]	
Türevsel Termal Kalorimetri	±0,5K(600K kadar) ±2,0K(1273K kadar)	ASTM E 537-76
Türevsel Tarama Kalorimetrisi	±0,5K(600K kadar) ±2,0K(1273K kadar)	ASTM E 537-76

[1] Bu doğruluk oranı sadece ASTM D 1120-72'de tarif edilenler gibi olan basit aygıtlar için geçerlidir. Daha gelişmiş ebulliyometre cihazları ile geliştirilebilir.
[2] Sadece saf maddeler için geçerlidir. Başka durumlarda kullanılması için test edilmesi gereklidir.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Bazı test yöntemlerinin işlemleri, ulusal ve uluslararası standartlarla tarif edilmiştir.(bakınız Ek-I)

1.6.1. Ebulliyometre

Bakınız Ek-I.

1.6.2. Dinamik yöntem

Buhar basıncının belirlenmesi için test metodu A.4'e bakınız

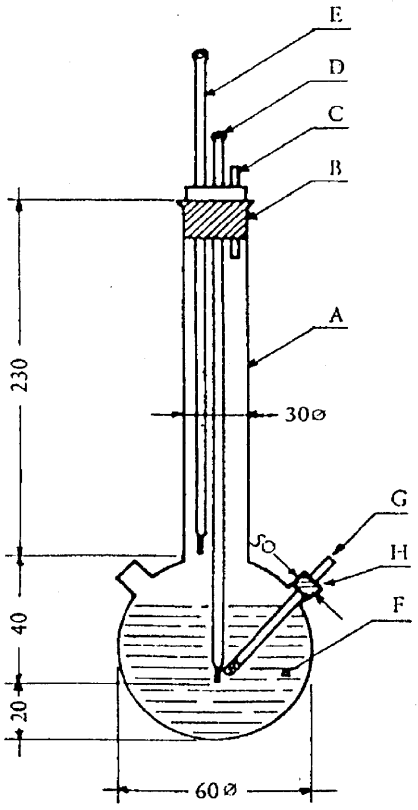
101,325kPa basınç uygulaması ile elde edilen kaynama sıcaklığı kaydedilir.

1.6.3. Damıtma işlemi (kaynama aralığı)

Bakınız Ek-I.

1.6.4. Siwoloboff yöntemi

Numune yaklaşık 5 mm (şekil 1) çapındaki bir test tüpünün içerisinde bir erime sıcaklığı düzeneğine konularak ısıtılır. Şekil 1, standart bir eritme ve kaynatma düzeneğinin örneğini göstermektedir (JIS K 0064) (camdan yapılmış, bütün ölçüleri milimetre cinsinden).



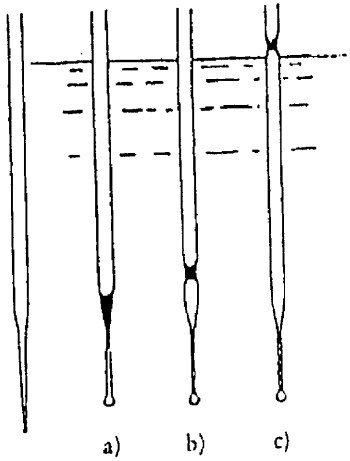
Şekil 1

A: Ölçüm kabı
B: Tıpa
C: Havalandırma tüpü
D: Termometre
E: Yardımcı termometre
F: Banyo sıvısı
G: Dış çapı en fazla 5 mm olan ve içinde; yaklaşık 100 mm uzunlukta ve yaklaşık 1 mm iç çapında olan ve kalınlığı yaklaşık 0,2 ile 0,3 mm bir kılcal tüp olan örnek tüpü
H: Kenar tüpü

Alt ucunun 1 cm üstünden kapatılmış olan kılcal tüp, numune tüpünün içine yerleştirilir. Test maddesi kılcal tüp içine doldurulduğunda kapatılmış kısımla birlikte sıvının altında olmalıdır. İçinde kaynama kılcal tüpü bulunan test tüpü bir kauçuk bantla yada kenar tüpünün yardımı ile termometreye sabitlenir (bakınız şekil 2).



Şekil 2
Siwoloboff yöntemi



Şekil 3
Düzenlenmiş ilke

Banyo sıvısı kaynama sıcaklığı göz önüne alınarak seçilir. 573K'ya kadar olan sıcaklıklarda silikon yağı kullanılabilir. Sıvı parafin sadece 473 K'ya kadar olan sıcaklıklarda kullanılabilir. Banyo sıvısının ısıtılması ilk olarak 3K/dak. olarak ayarlanmalıdır. Banyo sıvısı mutlaka karıştırılmalıdır. Tahmin edilen kaynama sıcaklığına yaklaşık 10K kaldığında, ısıtma 1K/dak. dan daha az yükselecek şekilde ayarlanmalıdır. Kaynama sıcaklığına ulaşıldığında, kabarcıklar hızla kaynama kılcalında belirmeye başlar.

Kaynama sıcaklığı, anlık soğumanın olduğu, sıra halindeki baloncukların kaybolduğu ve sıvının aniden kılcal içerisinde yükselmeye başladığı sıcaklıktır. Bu esnada çalışan termometrenin gösterdiği sıcaklık maddenin kaynama sıcaklığıdır.

Modifiye edilmiş prensipte (şekil 3), kaynama sıcaklığı erime sıcaklığı, ölçen kılcalla ölçülür. Kılcal 2 cm uzunluğa kadar dikkatlice uzatılır (a) ve içerisine küçük miktarda örnek emdirilir. Kılcalın açık ucu eritilerek kapatılır, böylece hava kabarcığı uca hapsedilir. Erime sıcaklığı düzeneği (b) ısıtılırken, hava baloncuğu büyür. Kaynama sıcaklığı, maddenin tıpasının banyo sıvısının yüzeyine ulaştığı sıcaklığı göstermektedir.

1.6.5. Fotoselle tespit

Numune bir kılcal içerisinde ısıtılmış metal blokların arasına konularak ısıtılır.

Bir ışık demeti metal bloklarda açılmış uygun deliklerin içinden örnek sıvısının üzerinden geçerek hassas ayarlı fotosele gönderilir.

Numunenin sıcaklığı artarken, hava kabarcıkları kaynama kılcalından yükselmeye başlar. Kaynama noktasına ulaşıldığında ise kabarcık sayısı oldukça fazla miktarda artar.

Kabarcıklardaki bu artış ışığın yoğunluğunda değişikliğe neden olur, bu değişiklik fotosel tarafından kaydedilir ve metal bloğun içerisindeki sıcaklığı ölçen platin dirençli termometreye durma sinyali yollar.

Bu yöntem oldukça kullanışlıdır çünkü oda sıcaklığından, 253,15 K (- 20° C) ne kadar düşük sıcaklıklara, düzenekte herhangi bir değişiklik yapılmadan kullanılabilir. Fakat bu cihazın soğuma banyosuna sokulması gereklidir.

1.6.6. Termal analiz

1.6.6.1.Türevsel termal analiz

Bakınız Ek-I.

1.6.6.2.Türevsel taramal analiz

Bakınız Ek-I.

2. VERİLER

Normal basınçtan sapma durumlarında (maks.± 5kPa), kaynama sıcaklığı, aşağıda yer alan ve Sidney Young tarafından geliştirilmiş sayı-değer eşitliğinin kullanımı ile, T_n'e normalize edilir;

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

Burada:

$\Delta p = (101{,}325-p)$ [not edilen]

p = kPa cinsiden basınç

f_T = kaynama sıcaklığının K/kPa cinsinden değişim hızı

T = K cinsinden ölçülmüş kaynama sıcaklığı

T_n = Kaynama sıcaklığının K cinsinden normal basınca düzeltilmiş hali

Sıcaklık-düzeltme faktörleri, f_T, ve yaklaşımlarında kullanılan denklemler yukarıda bir çok bileşik için bahsedilen ulusal ve uluslararası standardlarda yer alır.

Örneğin, DIN 53171 yöntemi, boyalarda yer alan, çözücüler için aşağıda kabataslak belirtilmiş düzeltmelerinden bahsetmektedir.

TABLO 2: SICAKLIK – DÜZELTME FAKTÖRLERİ f_T

Sıcaklık T (K)	Düzeltme faktörü 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	0,4
548,15	0,45
573,15	0,47

3. RAPORLAMA

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan yöntem
- maddenin ayrıntılı özellikleri (Belirlenmesi ve safsızlıkları) ve eğer varsa başlangıçtaki saflaştırma basamağı
- tahmini doğruluk

Tahmini doğruluk aralığında yer alan ölçülmüş en az iki değerin ortalaması (bakınız Tablo 1) kaynama sıcaklığı olarak rapor edilir.

Ölçülmüş kaynama sıcaklıkları ve ortalamaları ile basınç ölçümleri kPa biriminde rapor edilmelidir. Basıncın normal atmosferik basınç değerlerine yakın olması tercih edilir.

Sonuçların yorumlanması ile ilgili bütün bilgiler ve açıklamalar raporda verilmelidir, özellikle de maddenin fiziksel hali ve saflık derecesi dikkate alınmalıdır.

4. KAYNAKLAR

(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, volume II.

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

Ek-I

İlave teknik detaylar için aşağıda bulunan standardlara başvurulabilir:

1. Ebulliyometre

ASTM D 1120-72	Motor antifrizleri için standard kaynama noktası test yöntemi

2. Damıtma işlemi (kaynama aralığı)

TS ISO 918	Sanayide kullanılan uçucu organik sıvılar - Damıtma özelliklerinin tayini
BS 4349/68	Damıtılmış petrol ürünlerini tayin metodu
BS 4591/71	Damıtma özellikleri tayin metodu
DIN 53171	Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Damıtma:determination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. Türevsel termal analiz ve türevsel taramalı kalorimetri

ASTM E 537-76	Değişken termik analiz metodu ile kimyasalların termal kararlılıklarını tayin etme Metodu
ASTM E 473-85	Termik analizle bağlantılı standard açıklamalar
ASTM E 472-86	Termoanalitik verilerin rapor edilmesi için standard uygulama
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

A.3 BAĞIL YOĞUNLUK

1. YÖNTEM

Burada bahsedilen yöntemlerin çoğu OECD Test Dokümanına dayanarak tanımlanmıştır (1). Temel ilkeler referans (2)'de verilmiştir.

1.1. Giriş

Bağıl yoğunluğun belirlenmesi için tarif edilen yöntemler saflık dereceleriyle ilgili herhangi bir sınırlama olmaksızın katı ve sıvı maddelere uygulanabilir. Kullanılacak çeşitli yöntemler Tablo 1'de listelenmiştir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Katı veya sıvıların bağıl yoğunluğu D^{20}_4, ilgili maddenin kütlesinin hacmine oranıdır. 20^0C'de belirlenir ve aynı hacimdeki suyun kütlesi 4^0C'de belirlenir. Bağıl yoğunlukta birimsizdir.

Maddenin yoğunluğu, (ρ); kütlesinin (m) hacmine (v) bölümüdür.

Yoğunluk (ρ) SI biriminde kg/m^3 olarak verilir.

1.3. Referans maddeler (1) (3)

Yeni bir maddenin incelendiği her durumda referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Yöntemin çalışabilirliliğini zaman zaman kontrol etmek amacıyla kullanılırlar ve diğer yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarlar.

1.4. Test yönteminin ilkesi

4 çeşit yöntem kullanılmaktadır.

1.4.1. Yüzme (Bouyancy) yöntemi

1.4.1.1. Hidrometre (sıvı maddeler için)

Yeterince kesin ve hızlı yoğunluk belirlemeleri, sıvının yoğunluğunun batan kısmının derinliğinin dereceli skaladan okunarak bulunmasına olanak sağlayan yüzen hidrometrelerle elde edilebilir.

1.4.1.2. Hidrostatik denge (katı ve sıvı maddeler için)

Test örneğinin havadaki ve uygun sıvıdaki (su gibi) ağırlık farkı ölçümü, örneğin yoğunluğunun belirlenmesinde kullanılabilir.

Katılar için, ölçülen yoğunluk kullanılan numunenin sadece bir kısmını temsil eder. Sıvıların yoğunluğunun belirlenmesinde bilinen hacminin (v) ağırlığı önce havada daha sonra sıvıda tartılır.

1.4.1.3. Batan gövde yöntemi (Sıvı maddeler için) (4)

Bu yöntemde sıvının yoğunluğu, hacmi bilinen bir gövdenin test sıvısında batmadan önceki ve sonraki sıvının tartılması ile elde edilen sonuçların farkının alınmasıyla belirlenir.

1.4.2. Piknometre yöntemleri

Katı veya sıvılar için bilinen hacimde ve çeşitli şekillerde piknimetreler kullanılabilir. Yoğunluk, dolu ve boş piknometre arasındaki ağırlık farkı ve onun bilinen hacminden hesaplanır.

1.4.3. Hava karşılaştırmalı piknometre (katılar için)

Herhangi bir biçimdeki katının yoğunluğu, oda sıcaklığında gaz karşılaştırmalı piknometreyle ölçülür. Değişken hacim ayarlı bir silindirin içindeki hava veya soy gaz içindeki madde hacmi ölçülür. Yoğunluk hesaplaması için hacim ölçümü bittikten sonra tek bir kütle ölçümü yapılır.

1.4.4. Salınımlı yoğunluk ölçer (5) (6) (7)

Sıvı yoğunluğu salınımlı densimetrelerle ölçülebilir. Yerleştirilen U-borusu şeklindeki mekanik osilatör, kütleye bağlı olarak osilatörün rezonans frekansında salınır. Numune verilmesi osilatörün rezonans frekansını değiştirir. Düzenek, yoğunluğu bilinen iki sıvıyla kalibre edilmesi gerekir. Bu maddeler tercihen yoğunlukları ölçüm yapılacak aralığı kapsayacak şekilde seçilmelidir

1.5. Kalite kriterleri

Bağıl yoğunluk belirlenmesinde kullanılan farklı yöntemlerin uygulanabilirlikleri tabloda sıralanmıştır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Örnek olarak verilen ve ilave teknik detaylar için başvurulması gereken standartlar, ilgili EK-I'de yer almaktadır.

Testler 20 ^{0}C ta yapılmalı ve en az 2 ölçüm gerçekleştirilmelidir.

2. VERİLER

Standardlara bakınız.

3. RAPORLAMA

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan yöntem
- maddenin tam olarak özellikleri (tanımı ve safsızlıkları), varsa başlangıçtaki saflaştırma basamağı

Bağıl yoğunluk D_4^{20}, ölçümü yapılan maddenin fiziksel haliyle birlikte 1.2'de anlatıldığı gibi raporlanmalıdır.

Sonuçların yorumu için ilgili bütün bilgilerin ve hatırlatmaların, özellikle de maddenin safsızlığı ve fiziksel haline bağlı olanların, rapor edilmesi gerekir.

Tablo: Yöntemlerin uygulanabilirliği

Ölçüm yöntemi	Yoğunluk		Olası en fazla dinamik vizkosite	Mevcut Standardlar
	Katı	Sıvı		
1.4.1.1. Hidrometre		evet	5 Pa s	TS 617, TS 2460-2 ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrostatik denge				
(a) katılar	evet			TS EN ISO 1183 -1,
(b) sıvılar		evet	5 Pa s	TS 922 VE TS 781 ISO 758,
1.4.1.3. Batan gövde yöntemi		evet	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometre				
(a) katılar	evet			TS ISO 3507 TS EN ISO 1183 -2, NF T 20-053
(b) sıvılar		evet	500 Pa s	TS 781 ISO 758,
1.4.3.Hava karşılaştırmalı piknometre	evet			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4. Salınımlı yoğunluk ölçer		evet	5 Pa s	

4. KAYNAKLAR

(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, 508.

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

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

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

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9,253-255.

Ek-I

İlave teknik detaylar için aşağıdaki standartlardan yararlanılabilir.

1. Yüzme (Buoyancy) yöntemleri

1.1 Hidrometre

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
TS 2460-2 ISO 649-2	Genel Amaçlı Yoğunluk Hidrometreleri Kısım 2 Deney Metotları ve Kullanım
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 Hidrostatik denge

Katı maddeler için

TS EN ISO 1183-1	PlastiklerGözeneksiz plastikler-Yoğunluk tayin metotları-Bölüm 1: Daldırma metodu, sıvı piknometre metodu ve titrasyon metodu
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

Sıvı maddeler için

TS 922 TS 781 ISO 758	Sanayide Kullanılan Sıvı Kimyasal Ürünler – 20°C'da Yoğunluk Tayini
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62 ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

Batan gövde yöntemi

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

2. Piknometre yöntemi

2.1 Sıvı maddeler için

TS ISO 3507	Piknometreler
TS 781 ISO 758	Sanayide Kullanılan Sıvı Kimyasal Ürünler - 20°C'da Yoğunluk Tayini
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 l00 . 10-6 m2 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 l00 . 10-6 m2 s-1 at 20 °C, applicable in particular also to

	hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol - water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757 Point 7	Testing of min eral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297 Section 15	Rubber products - chemical analysis
ASTM D 2111 Method C	Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary- stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids - Pyknometric method

2.2 Katı maddeler için

TS EN ISO 1183-2	Plastikler-Gözeneksiz plastikler-Yoğunluk tayin metotları-Bölüm 2: Gradyen yoğunluk kolonu metodu
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 densit y of soils

3. Hava karıştırmalı piknometre

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

A.4. BUHAR BASINCI

1. YÖNTEM

Bu yöntem, OECD TG 104 (2004)'e eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Yöntem A.4'ün bu revize edilmiş bu versiyonu; Efüzyon (sızınım/delikten yayılma) yöntemi: düşük basınçlı (10^{-10}Pa'a kadar) maddeler için tasarlanan, izotermal ısıl ağırlıklı ölçüm gibi ek bir yöntem içerir. Özellikle düşük buhar basınçlı maddeler için buhar basıncı elde etme ile ilgili olarak prosedürlere duyulan ihtiyaçlar ışığında, bu yöntemin diğer prosedürleri, diğer uygulanabilir aralıklara göre tekrar değerlendirilmiştir.

Termodinamik dengede saf maddenin buhar basıncı, sadece sıcaklık fonksiyonudur. Temel prensipler başka bir yerde (2) (3) tanımlanmaktadır.

Hiçbir basit ölçüm prosedürü, 10^{-10} -10^{5}Pa aralığından daha az buhar basıncının tam aralığına uygulanamaz. Buhar basıncı ölçmek için sekiz yöntem, değişik buhar basıncı aralıklarında uygulanabilen bu yöntemin kapsamındadır. Tablo 1'de uygulama ve ölçme aralıkları ile ilgili olarak çeşitli yöntemler kıyaslanmaktadır. Yöntemler sadece test koşulları altında bozulmayan bileşikler için uygulanabilir. Teknik nedenlerden dolayı deneysel yöntemlerin uygulanamadığı durumlarda, buhar basıncı hesaplanabilir ve önerilen tahmin yöntemi Ek-I'de gösterilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Bir maddenin buhar basıncı, katı veya sıvı bir madde üzerindeki doygunluk basıncı olarak tanımlanmıştır.

Basınç için SI birimi olan Pascal (Pa) kullanılmalıdır. Geçmişte kullanılmış olan diğer birimler çevrim katsayıları ile birlikte burada verilmektedir:

1Torr	= 1 mm Hg	= $1{,}333 \times 10^{2}$Pa
1atmosfer	= $1{,}013 \times 10^{5}$ Pa	
1bar	= 10^{5} Pa	

Sıcaklığın SI birimi kelvin (K) dir. Santigrat derece aşağıdaki formüle göre Kelvin'e dönüştürülür:

$T = t + 273{,}15$

Burada T, kelvin ya da termodinamik sıcaklıktır ve t, Santigrat sıcaklıktır.

Tablo 1

Ölçme yöntemi	Maddeler		Hesaplanan Tekrarlanabilirlik	Hesaplanan Yeniden üretilebilirlik	Tavsiye edilen aralık
	Katı	Sıvı			
Dinamik yöntem	Kolay eriyen	Evet	%25'e kadar %1 den 5'e kadar	%25'e kadar %1 den 5'e kadar	10^3Pa'dan 2×10^3Pa'a 2×10^3Pa'dan 10^5Pa'a
Statik yöntem	Evet	Evet	%5 ten 10'a	%5 ten 10'a	10 Pa'dan10^3Pa'a 10^{-2}Pa'dan 10^5Pa'a (1)
İzoteniskop yöntem	Evet	Evet	%5 ten 10'a	%5 ten 10'a	10^2Pa'dan 10^5Pa'a
Efüzyon yöntemi: Buhar basıncı dengesi	Evet	Evet	%5 ten 20'ye	%50'ye kadar	10^{-3} ten 1 Pa'a
Efüzyon yöntemi: Knudsenhücresi	Evet	Evet	%10 dan 30'a	-	10^{-10} dan 1 Pa'a
Efüzyon (sızınım/delikten yayılma) yöntemi: İzotermal ısıl ağırlık ölçümü	Evet	Evet	%5 ten 30'a	%50'ye kadar	10^{-10} dan 1 Pa'a
Gaz doygunluk yöntemi	Evet	Evet	%10 dan 30'a	%50'ye kadar	10^{-10} dan 10^5Pa'a
Dönen pervane yöntemi	Evet	Evet	%10 dan 20'ye	-	10^{-4} dan 0,5 Pa'a

(1) Sığa(Kapasitans) manometresi kullanırken

1.3. Test ilkesi

Genellikle buhar basıncı, çeşitli sıcaklıklarda belirlenir. Sınırlı bir sıcaklık aralığında, saf bir maddenin buhar basıncı logaritması, sadeleştirilmiş Clausius-Clapeyron denklemine göre termodinamik sıcaklığın ters çevrilmiş doğrusal bir fonksiyonudur:

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

Burada:

p = buhar basıncı (pascal)
ΔHv = buharlaşma ısısı (J mol^{-1})
R = evrensel gaz sabiti, 8,314 $Jmol^{-1}\ K^{-1}$
T = sıcaklık (K)

1.4. Referans maddeler

Referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Bunlar, esas olarak bir yöntem performansını kontrol etmek ve farklı yöntemlerin sonuçları arasında karşılaştırma yapabilmek için imkan sağlarlar.

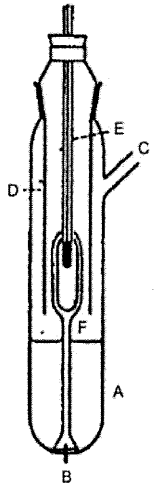
1.5. Yöntemin Tanımı

1.5.1. Dinamik yöntem (Cottrell yöntemi)

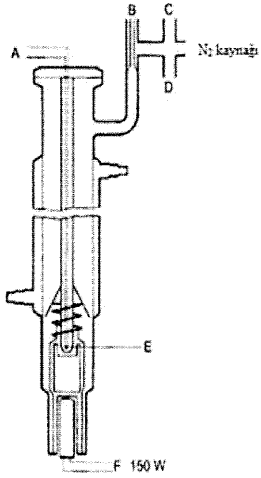
1.5.1.1. İlke

Buhar basıncı, yaklaşık olarak 10^3 ve 10^5 Pa arasındaki belirlenmiş farklı basınçlarda maddenin kaynama sıcaklığını ölçerek hesaplanır. Bu yöntem kaynama sıcaklığının belirlenmesi için de tavsiye edilir. Bu amaçla 600 K' e kadar kullanışlıdır. Sıvıların kaynama sıcaklıkları, sıvı dikecinin hidrostatik basıncından dolayı 3 ile 4 cm arasındaki derinlikte

yüzeydekinden yaklaşık olarak 0,1 °C'den daha yüksektir. Cottrell yönteminde (4) termometre, sıvı yüzeyinin üstündeki buhar içine yerleştirilir ve kaynayan sıvının devamlı olarak kendini termometre haznesinin üzerine pompalaması sağlanır. Atmosferik basınçta buhar ile denge durumda olan sıvının ince bir tabakası hazneyi kaplar. Bu sebeple termometre, aşırı ısınma ya da hidrostatik basınçtan kaynaklanan bir hata olmaksızın doğru kaynama noktasını gösterir. Orijinal olarak Cottrell'in kullandığı pompa Şekil 1'de gösterilmektedir. Tüp A kaynayan sıvı içerir. Platin bir tel, B, eşit kaynamaya olanak sağlayan tabana tutturulmuştur. C yan tüpü yoğunlaştırıcı ile sonlanır ve kılıf D, termometre E'ye ulaşarak yoğunlaşan soğukluğu korur. A içerisindeki sıvı kaynadığında, huni ile tutulan kabarcıklar ve sıvı, termometre haznesi üzerinden F pompasının kolu aracılığıyla dökülür.



Şekil 1



Şekil 2

Cottrell pompası (4)
A: Termoçift
B. Vakum tampon hacmi
C: Basınç göstergesi
D: Vakum
E: Ölçüm noktası
F: Isıtma elemanı c.a. 150 W

1.5.1.2. Düzenek

Cottrell prensibini kullanan çok hassas düzenekler Şekil 2'de gösterilmektedir. Alt kısmında kaynama bölümü, orta kısmında bir soğutucu ve üst kısmında çıkış yeri ve bağlantı (flanj) bulunan bir tüpten oluşur. Cottrell pompası, elektrikli filtre elemanı vasıtasıyla ısıtılan kaynatma bölümüne yerleştirilir. Sıcaklık, kılıflı termoçift ile ya da üst kısımdaki flanj boyunca dirençli termometre yerleştirilerek ölçülür. Çıkış noktası basınç düzenleme sistemine bağlanır. Sonraki kısım ise vakum pompası, tampon hacmi, basıncı düzenlemek için azot gazı girişine izin veren manostat ve manometreden oluşur.

1.5.1.3. Yöntem

Madde kaynama bölümüne yerleştirilir. Toz halinde olmayan katılar ile ilgili olarak problemler ile karşılaşılabilir fakat bunlar bazen soğutma ceketi ısıtılarak çözülebilir. Düzenek, flanj ve gazı giderilmiş maddeye tutturulmuştur. Köpük maddeler bu yöntem kullanılarak ölçülemez.

İstenen en düşük basınç ayarlandıktan sonra ısıtma başlatılır. Aynı anda sıcaklık sensörü bir kayıt cihazına bağlanır.

Sabit basınçta sabit bir kaynama sıcaklığı kaydedildiğinde dengeye ulaşılır. Kaynama esnasında darbeden kaçınmak için özel tedbirler alınmalıdır. Ayrıca, soğutucuda tam yoğunlaşma gerçekleşmelidir. Düşük sıcaklıkta eriyen katıların buhar basıncı belirlenirken yoğuşturucunun tıkanmasını engellemek için tedbir alınmalıdır.

Bu denge noktasının kayıt edilmesinden sonra daha yüksek bir basınç ayarlanır. Süreç 10^5Pa'a ulaşılana kadar (toplam yaklaşık olarak 5 ila 10 ölçme noktası) bu şekilde devam eder. Kontrol olarak denge noktaları, alçalan basınçta tekrarlanmalıdır.

1.5.2. Statik Yöntem

1.5.2.1. İlke

Statik yöntemde (5), termodinamik dengedeki buhar basıncı, belirli bir sıcaklıkta belirlenir. Bu yöntem, 10^{-1}'den 10^5 Pa'a kadar olan aralığa ek olarak gereken tedbirlerin alınması halinde 1'den 10 Pa'a kadar olan aralıkta da maddeler ve çok bileşenli sıvı ve katılar için uygundur.

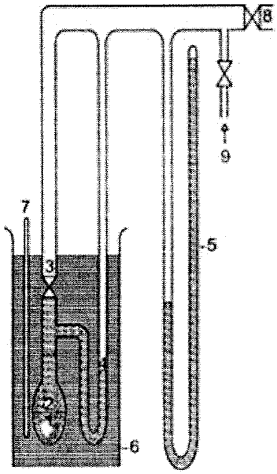
1.5.2.2. Düzenek

Ekipman, sabit bir sıcaklık banyosu (± 0,2 K hassaslıkta), vakum hattına bağlanmış numune için bir kap, bir manometre ve basıncı düzenlemek için bir sistemden oluşur. Örnek kısım (şekil 3a), valf ve sıfır indikatör olarak hizmet eden diferansiyel manometre (uygun manometre sıvısı içeren U-tüp) yoluyla vakum ağına bağlanır. Cıva, silikonlar ve fitalatlar, basınç aralığına ve test maddesinin kimyasal davranışına bağlı olarak diferansiyel manometrede kullanım için uygundur. Bununla birlikte, çevre sağlığı açısından mümkün olduğunca cıva kullanımından kaçınılmalıdır. Test maddesi U-tüp sıvısı içinde belirgin ölçüde çözülmemeli ya da reaksiyona girmemelidir. U-tüp yerine manometre kullanılabilir (şekil 3a). Manometrede, silikon sıvıları ve fitalatlar 10 Pa ila 10^2Pa aralığında kullanım için uygun iken 10^2Pa ila normal basınç aralığında cıva kullanılabilir. 10^2Pa'ın altında kullanılabilen diğer basınçölçerler bulunmaktadır ve ısıtılabilir membran kaplamalı manometreler 10^{-1}Pa'ın altında kullanılabilir. Sıcaklık, numune içeren kap duvarının dışında ya da kabın kendisinin içinde ölçülür.

1.5.2.3. Prosedür

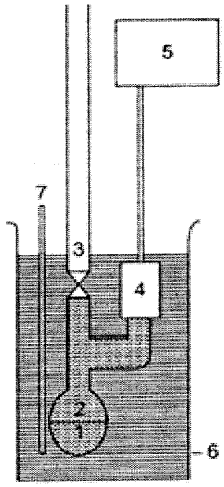
Şekil 3a'da tanımlanan düzenekleri kullanarak, okumalar alınmadan önce yükseltilmiş sıcaklıkta gazı giderilmiş olması gereken seçilmiş sıvı ile U-tüp doldurulur. Test maddesi, düzeneğin içine yerleştirilmeli ve sıcaklık azaltılarak gazı giderilmelidir. Çok bileşenli numune olması durumunda, malzemenin bileşiminin değişmemesini garanti altına alabilmek için sıcaklık yeterince düşük olmalıdır. Denge, karıştırmayla daha çabuk kurulabilir. Numune,

sıvı azot veya kuru buz ile soğutulabilir fakat hava ya da pompa sıvısının yoğunlaşmasından kaçınmak için tedbir alınmalıdır. Havayı çıkarmak için açık numune kabının üzerinden birkaç kez vana ile emme uygulanır. Gerekirse gazın giderilmesi işlemi birkaç kez tekrarlanır.



1: Test maddesi
2:Buhar fazı
3: Yüksek vakum vanası
4: U-borusu (yardımcı manometre)
5: Basınç göstergesi
6: Sıcaklık banyosu
7: Sıcaklık ölçüm cihazı
8: Vakum pompası
9: Havalandırma/azot gazı

Şekil 3a



1: Test maddesi
2:Buhar fazı
3: Yüksek vakum vanası
4: Basınç ölçer
5: Basınç göstergesi
6: Sıcaklık banyosu
7: Sıcaklık ölçüm cihazı

Şekil 3b

Numune, vana kapalı iken ısıtıldığında buhar basıncı artar. Bu, U-tüp içerisindeki sıvı dengesini değiştirir. Bu durumu dengelemek amacıyla diferansiyel basınç göstergesi tekrar sıfır olana kadar düzeneğe azot gazı ve hava girmesi sağlanır. Bunun için gerekli olan basınç manometre ya da daha hassas bir cihaz ile okunabilir. Bu basınç, ölçüm sıcaklığındaki maddenin buhar basıncına karşılık gelir. Şekil 3b de tanımlanan düzenek kullanılarak buhar basıncı direkt olarak okunabilir.

Buhar basıncı, istenen maksimum sıcaklığa kadar uygun olarak küçük sıcaklık aralıklarında (yaklaşık olarak 5 ila 10 ölçüm noktası içerisinde) belirlenebilir.

Düşük sıcaklık okumaları, kontrol amacıyla tekrar edilmelidir. Eğer tekrar edilen okumalardan elde edilen değerler sıcaklığı arttırmak için elde edilen eğri ile örtüşmez ise bu aşağıdaki durumlardan dolayı olabilir:

(i)numune hala hava içeriyor olabilir (örn. yüksek viskozlu materyaller) ya da ısıtma sürecinde düşük kaynamalı madde ya da maddelerin serbest bırakılması;

(ii) maddenin incelenmiş sıcaklık aralığında kimyasal bir reaksiyona maruz kalması (örn. Bozunma, polimerleşme).

1.5.3. İzoteniskop Yöntemi

1.5.3.1. İlke

İzoteniskop (6) statik yöntemin ilkesine dayanır. Yöntem, sabit sıcaklıkta korunan bir hazne içine bir numune yerleştirilmesini ve bir manometreye ve bir vakum pompasına bağlanmasını kapsar. Maddeden daha uçucu safsızlıklar, düşük basınçta gazı giderilerek uzaklaştırılır. Seçilmiş sıcaklıklardaki numunenin buhar basıncı, bilinen bir soy gaz ile dengelenir. İzoteniskop, belirli sıvı hidrokarbonlarının buhar basıncını ölçmek için geliştirilmiştir fakat buna ek olarak katıların incelenmesi için de uygundur. Yöntem genellikle çok bileşenli sistemler için uygun değildir. . Uçucu olmayan safsızlıklar içeren numunelerden elde edilen sonuçlarda, küçük ve önemsiz hatalar olabilir. Tavsiye edilen aralık 10^2'dan 10^5'Pa'a kadardır.

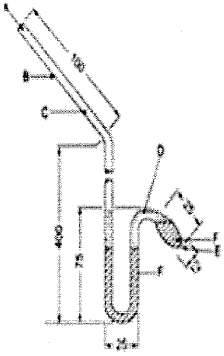
1.5.3.2. Düzenek

Ölçme cihazının bir örneği şekil 4'te gösterilmektedir. Tam açıklaması, ASTM D 2879-86 (6) içerisinde bulunmaktadır.

1.5.3.3. Prosedür

Sıvı olması halinde, madde diferansiyel manometre içindeki sıvı gibi davranır. Hazneyi ve manometrenin kısa kolunu doldurmak için yeterli miktarda sıvı izoteniskop içerisine yerleştirilir. İzoteniskop, bir vakum sistemine bağlanır ve boşaltılır, daha sonra azot gazı ile doldurulur. Kalan oksijenin atılması için boşaltma ve sistemin (yabancı maddelerden) temizlenmesi işlemleri iki kez tekrar edilir. Doldurulmuş izoteniskop yatay bir şekilde yerleştirilir, bu sayede numune, numune haznesi ve manometre içindeki ince bir tabaka içerisine yayılır. Sistem basıncı 133 Pa'a düşürülür ve numune yavaş bir şekilde kaynayana kadar ısıtılır (çözülmüş gazların uzaklaştırılması). Daha sonra izoteniskop yerleştirilir ve bu sayede numune hazneye döner ve manometrenin kısa koluna dolar. Basınç, 133 Pa'da tutulur. Hazne ve manometre kolunun üst kısmından numunenin bir kısmını çıkarmak için serbest bırakılmış numune buharı manometre içerisine yeteri miktarda yayılana kadar, numune haznesinin işlenmiş ucu, buhar ile doldurulmuş ve azotsuz alan oluşturarak, küçük bir alev ile ısıtılır. İzoteniskop daha sonra sabit sıcaklık banyosuna yerleştirilir ve azot gazı basıncı, numuneninki ile eşit olana kadar ayarlanır. Dengede iken azot gazı basıncı maddenin buhar basıncına eşittir.

Katı olması halinde, basınç ve sıcaklık aralığına bağlı olarak silikon sıvılar ve fitalatlar gibi manometre sıvıları kullanılır. Gazı giderilmiş manometre sıvısı, izoteniskopun uzun kolu üzerinden sağlanan çıkıntı içerisine konur. Daha sonra incelenecek olan katı cisim, numune haznesinin içerisine yerleştirilir ve yüksek sıcaklıkta gazı giderilir. Bu işlemden sonra, izoteniskop eğilir ve bu sayede manometre sıvısı U-tüp içine akar.



A: Basınç kontrolü
B: 8 mm OD borusu
C: Basınç sistemindeki kuru azot gazı
D: Numune buharı
E: Küçük uç
F: Sıvı numune

Ölçüler mm cinsindendir.

Şekil - 4

1.5.4. Efüzyon Yöntemi: buhar basıncı dengesi (7)

1.5.4.1. İlke

Test maddesi numunesi küçük bir fırında ısıtılır ve içi boş bir cam fanus içerisine yerleştirilir. Fırın bilinen çaplarda küçük oyukları bulunan bir kapak ile kapatılır. Deliklerden herhangi birisinden dışarı çıkan madde buharı, boşaltılmış cam fanus içerisine yerleştirilmiş durumda olan yüksek derecede hassas bir terazi kefesine yönlendirilir. Bazı tasarımlarda terazi kefesi, ısı iletimi ile dışarıya ısı çıkışı sağlanarak soğutucu kutu yardımıyla etrafı sarılır ve radyasyon ile soğutulur bu sayede kaçan buhar terazi kefesinde yoğunlaşır. Buhar püskürtmesinin momentumu dengedeki bir güç gibi davranır. Buhar basıncı iki yolla elde edilebilir: doğrudan tera[illegible]ndeki güçten ve ayrıca Hertz-Knudsen denkliği kullanılarak buharlaşma hızı

Şekil 4

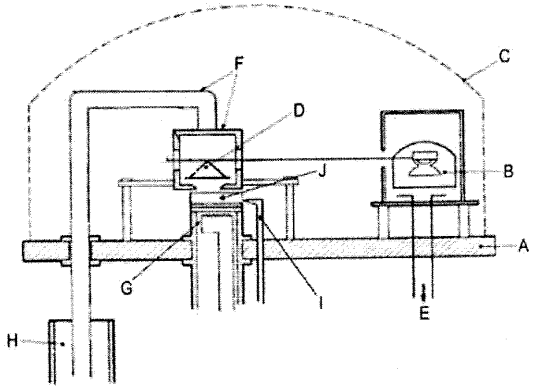
$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RTx10^3}{M}}$$

G = buharlaşma hızı (kg s^{-1} m^{-2})
M = molar kütle (g mol^{-1})
T = sıcaklık (K)
R = evrensel molar gaz sabiti (Jmol^{-1} K^{-1})
p = buhar basıncı (Pa)

Tavsiye edilen aralık 10^{-3}'ten 1 Pa'a kadardır.

1.5.4.2. Düzenek

Düzeneğin genel ilkeleri Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 5

A:	Taban levhası	F:	Soğutucu kutu ve soğutma kolu
B:	Döner bobinli alet	G:	Buharlaştırıcı fırın
C:	Cam fanus	H:	Sıvı azot ile dewar termosu
D:	Terazi kefesi ile denge	I:	Numune sıcaklığının ölçümü
E:	Vakum ölçüm cihazı	J:	Test maddesi

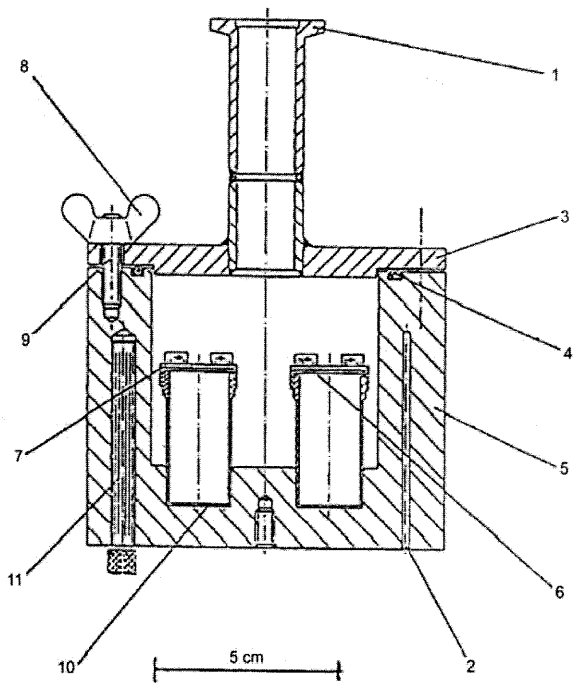
1.5.5. Efüzyon Yöntemi: Knudsen hücresi

1.5.5.1. İlke

Yöntem, mikro delik yoluyla yüksek vakum koşulları altında Knudsen hücresinin (8) her birim zamanda buhar olarak dışarıya çıkan test maddesi kütlesinin tahminine dayalıdır. Dışarı taşan (efüze olmuş) buhar kütlesi ya hücre kütlesi kaybının belirlenmesiyle ya da düşük sıcaklıktaki buharın yoğunlaştırılması ve kromatografi kullanarak uçucu hale getirilmiş madde miktarının belirlenmesiyle elde edilir. Buhar basıncı, düzenek parametrelerine (9) dayanan düzeltme faktörü ile ilişkili Hertz-Knudsen (bkz. Bölüm 1.5.4.1) uygulanarak hesaplanır. Tavsiye edilen aralık 10^{-10} ila 1 Pa'dır (10) (11) (12) (13) (14).

1.5.5.2. Düzenek

Düzeneğin genel ilkeleri Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6

1: Vakum bağlantısı
2: Platin dirençli termometre ya da sıcaklık ölçüm ve kontrol kuyuları
3: Vakum tankı kapağı
4: O-halkası/conta
5: Alüminyum vakum tankı
6: Sıvı birikim hücrelerinin kurulması ya da kaldırılması için cihaz
7: Vidalı kapak
8: Kelebek somunlar
9: Cıvata dişleri
10: Paslanmaz çelik sıvı birikim hücresi
11: Isıtıcı kartuş

1.5.6. Efüzyon Yöntemi: izotermal termogravimetri

1.5.6.1. İlke

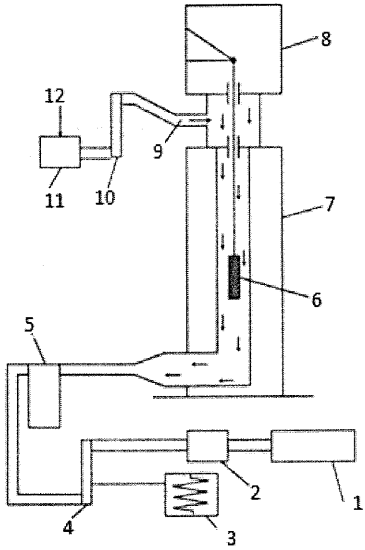
Yöntem, termogravimetri kullanarak yükseltilmiş sıcaklıkta ve ortam basıncında test maddesi için hızlandırılmış buharlaşma hızlarının belirlenmesine dayalıdır (10) (15) (16) (17) (18) (19) (20). Buharlaşma hızları v_T, seçilen bileşiğin yavaş bir şekilde akan soy gaz ortamına maruz bırakılması ve uygun zaman periyotları boyunca Kelvin cinsinden T olarak tanımlanan izotermal sıcaklıklarda ağırlık kaybının izlenmesiyle sonuç verir. Buhar basıncı p_T, buhar basıncı logaritması ve buharlaşma hızı logaritması arasındaki doğrusal ilişki kullanılarak v_T değerlerinden hesaplanır. Eğer gerek görülürse 20 ve 25 °C sıcaklıkların

ekstrapolasyonu(bilinene dayanan tahmin/dış değerlendirme) p_T ye karşı 1/T logaritmasının regresyon analizi ile yapılabilir. Bu yöntem, 10^{-10} Pa (10^{-12}mbar) kadar düşük buhar basıncına ve ölçülen ağırlık kayıplarının yanlış yorumlanmasından kaçınmak için olabildiğince %100'e yakın saflığa sahip maddeler için uygundur.

1.5.6.2. Düzenek

Düzenek kurulumunun genel ilkeleri şekil 7'de gösterilmektedir.

1: Emme pompası
2:Ayarlanabilir Vana
3: Grafik kaydedici
4: Çoklu hafif bariyer sistem ile sabit akım rotametresi
5: Soğurma ünitesi
6: Numune taşıma plakası
7: Fırın
8: Mikro terazi
9: N_2 gazı
10: Rotametre
11: Ayarlanabilir Vana
12: Ortam basıncındaki N_2 gazı



Şekil 7

Sıcaklık kontrollü haznede mikroterazi üzerinde asılı duran numune taşıyıcı bölüm, buharlaştırılmış test maddesi moleküllerini taşıyan kuru azot gazının akmasıyla sürüklenir. Hazneyi terk ettikten sonra gaz akışı, soğurma ünitesi tarafından arındırılır.

1.5.6.3. Prosedür

Test maddesi, homojen bir katman halinde pürüzlü cam levha yüzeyine uygulanır. Katı olması halinde, levha, uygun çözücü içindeki madde çözeltisi ile eşit oranda ıslatılır ve soygazlar atmosferde kurutulur. Ölçmek için, kaplanmış levha termogravimetrik analiz cihazı içerisine asılır ve sonrasında ağırlık kaybı zaman fonksiyonu olarak devamlı ölçülür.

Belirli bir sıcaklıktaki buharlaşma hızı v_T, numune levhasının ağırlık kaybından Δm şu şekilde hesaplanır:

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

Burada F kaplanmış test maddesinin yüzey alanıdır, normal olarak numune tabakasının yüzey alanı, ve t ağırlık kaybı Δm'nın gerçekleştiği zamandır.

Buhar basıncı p_T, buharlaşma hızının v_T fonksiyonuna bağlı olarak hesaplanır:

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

Burada C ve D ölçüm haznesinin çapına ve gaz akış hızına bağlı olarak kullanılmış deneysel düzenlemelere özgü sabit katsayılardır. Bu sabit katsayılar, buhar basıncı bilinen bir grubu ölçerek ve $\log v_T$'ye karşı $\log p_T$ regresyonu yapılarak bir kez belirlenmelidir (11) (21) (22).

Buhar basıncı pT ve Kelvin cinsinden sıcaklık T arasındaki ilişki aşağıdaki formül ile verilir

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

burada A ve B, 1/T'ye karşı $\log p_T$'nin regresyonu ile elde edilen sabitlerdir. Bu denklem ile buhar basıncı, ekstrapolasyon ile herhangi bir diğer sıcaklık için hesaplanabilir.

1.5.7. Gaz doygunluğu yöntemi (23)

1.5.7.1. İlke

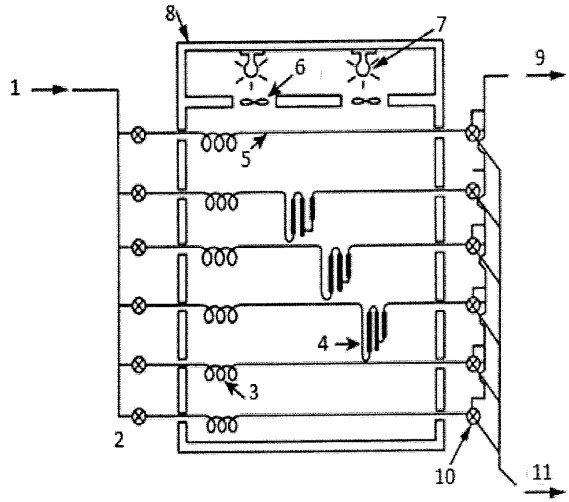
Soy gaz, doygunluğunu sağlamak için yeterince yavaş bir şekilde, oda sıcaklığında ve bilinen akış hızında test maddesi numunesinin içerisinden ya da üzerinden geçirilir. Gaz evresinde doygunluğa ulaşılması kritik öneme sahiptir. Taşınmış olan madde, genellikle bir sorbent (emici madde) kullanarak yakalanır ve miktarı belirlenir. Buhar toplama ve ardından gelen analize alternatif olarak, nicel olarak taşınmış olan materyal miktarını belirlemek için gaz kromatografisi gibi sıralı analitik teknikler kullanılabilir. Buhar basıncı, ideal gaz yasasına uyulduğu ve gaz karışımı toplam basıncının, bileşken gazların basınç toplamına eşit olduğu varsayımına dayanılarak hesaplanır. Buhar basıncı gibi, test maddesinin kısmi basıncı, bilinen toplam gaz hacminden ve taşınmış olan materyalin ağırlığından hesaplanır.

Gaz doygunluk prosedürü katı ya da sıvı maddelere uygulanabilir. Bu, 10^{-10} Pa'dan aşağı olan buhar basınçları için kullanılabilir (10) (11) (12) (13) (14). Yöntem, 10^3 Pa altındaki buhar basınçları için en güvenilirdir. 10^3 Pa üzeri için buhar basınçları, muhtemelen aerosol oluşumlardan dolayı genellikle fazla tahmin edilir. Buhar basıncı ölçümleri oda sıcaklığında yapıldığı için yüksek sıcaklıklardan ekstrapole (dışdeğer) veri bulmaya ihtiyaç duyulmaz ve çoğu kez ciddi hatalara neden olan yüksek sıcaklık ekstrapolasyonundan kaçınılır.

1.5.7.2. Düzenek

Prosedür sabit bir sıcaklık kutusunun kullanımını gerektirir. Şekil 8'deki çizim, ya katı ya da sıvı numunenin üç kopyadan oluşan analizi için izin veren üç katı ve üç sıvı numune taşıyıcı içeren bir kutuyu gösterir. Sıcaklık, ± 0,5 °C ya da daha iyi kontrol edilir.

1: N_2girişi
2:İnce dozaj vanası
3: Bakır bobin ısı dönüştürücüsü
4: Sıvı numune ve sorbent tutucu
5: Katı numune ve sorbent tutucu
6: Fan/vantilatör
7: Ampul
8: İzole edilmiş/yalıtılmış kutu
9: Akış hızı ölçere N_2 çıkışı
10: Üç yollu vana
11: N_2 çıkışı



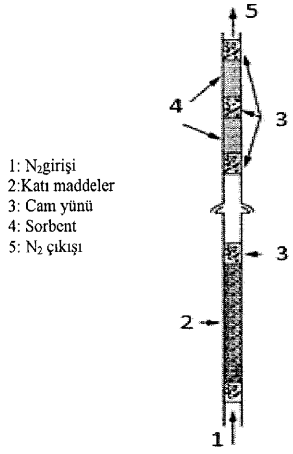
Şekil 8

Genellikle azot gazı soy taşıyıcı gaz olarak kullanılır fakat bazı durumlarda başka bir gaz da gerekli olabilir (24). Taşıyıcı gaz kuru olmalıdır. Gaz akımı, iğneli vanalarla (yaklaşık olarak 0,79 mm delik) kontrol edilen 6 akıma ayrılır ve 3,8 mm endüstriyel olarak tasarlanmış bakır boru yoluyla kutu içerisine akar. Sıcaklık dengesinden sonra gaz, numune ve sorbent tutucu içinden geçer ve kutudan çıkar.

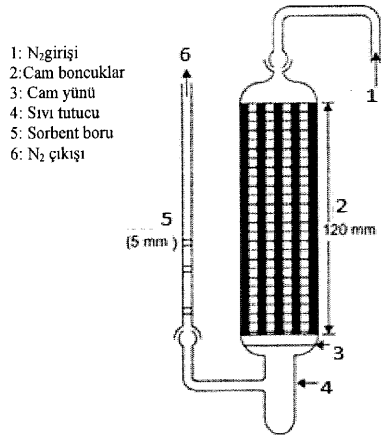
Katı numuneler, cam boru içerisine, 5 mm aralıklarla endüstriyel olarak tasarlanmış cam-yün tıkaçlar arasına doldurulur (bkz. Şekil 9). Şekil 10, bir sıvı numune tutucuyu ve sorbent sistemi gösterir. Sıvıların buhar basıncı ölçümü için en tekrarlanabilir yöntem, silika gibi soy bir sorbent ya da cam boncuklar üzerindeki sıvıyı kaplamak ve bu boncuklar ile tutucuyu bir arada tutmaktır. Alternatif olarak, taşıyıcı gazın, sıvı test maddesi sütunu içerisinden iri taneli cam hamuru ve kabarcık geçirmesi sağlanabilir.

Soğurucu sistem, ön ve arka soğurucu bölüm içerir. Oldukça düşük buhar basınçlarında sadece küçük miktarlar soğurucu ile elde edilebilir ve numune ve soğurucu arasındaki cam boru ve cam-yün üzerindeki adsorpsiyon ciddi bir probleme neden olabilir.

Katı CO_2 ile soğutulmuş tuzaklar, buharlaştırılmış materyali toplamak için kullanılan diğer bir etkili yöntemdir. Doyurucu sütun üzerinde herhangi bir geri/ters basınca neden olmazlar ve dahası nicelik bakımından toplanmış materyalleri uzaklaştırmak da oldukça kolaydır.



Şekil 9



Şekil 10

1.5.7.3. Prosedür

Taşıyıcı gazın akış hızı oda sıcaklığında ölçülür. Taşıyıcı gazın toplam hacmi için doğru bir değer olduğuna emin olmak için deney esnasında akış hızı sık sık kontrol edilir. Kütlesel akış hızı ölçer ile sürekli izleme tercih edilir. Gaz fazının doygunluğu dikkate değer bir temas süresi ve buna bağlı olarak da oldukça düşük gaz akış hızı gerektirebilir (25).

Deneyin bitiminde hem ön hem de arka soğurucu bölümler ayrı ayrı analiz edilir. Her bölümdeki bileşik, çözücü ekleyerek ayrıştırılır. Ortaya çıkan çözeltiler, her bölümden ayrıştırılmış olan ağırlığı belirlemek için nicelik olarak analiz edilir. Analitik yöntem seçimi (soğurucu ve ayrıştırıcı çözelti seçimi de dahil), test materyalinin özelliğine göre belirlenir. Ayrıştırma verimliliği, soğurucu üzerine bilinen miktarda numune enjekte ederek, ayrıştırarak ve toplanan miktarın analizi ile belirlenir. Test koşulları altında numune konsantrasyonunda ya da konsantrasyona yakın değerlerde ayrıştırma verimliliğini kontrol etmek önemlidir.

Taşıyıcı gazın test maddesi ile doyurulmasını sağlamak için üç değişik gaz akış hızı kullanılır. Eğer hesaplanmış buhar basıncı akış hızına bağlılık göstermez ise, gazın doy(urul)muş olduğu kabul edilir.

Buhar basıncı aşağıdaki denklem ile hesaplanır:

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

Burada:

p = buhar basıncı (Pa)
W = buharlaştırılmış test maddesinin kütlesi (g)
V = Doymuş gaz hacmi (m^3)

R = evrensel gaz sabiti 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = Sıcaklık (K)
M = Test maddesinin molar kütlesi (g mol^{-1})

Ölçülen hacimler, akış hızı ölçer ve doyurucu arasındaki basınç ve sıcaklık farklılıkları için doğrulanmalıdır.

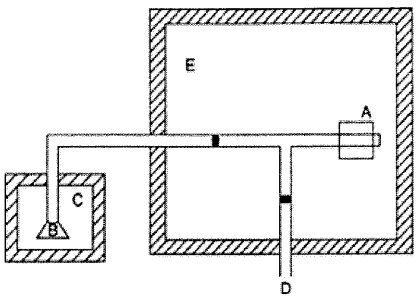
1.5.8. Döner çark

1.5.8.1. İlke

Bu yöntem, ölçme elementinin alanları döndürerek dönme/eğirme (spinning) gerçekleştirmek için manyetik alanda askıda duran küçük çelik bilye olduğu bir viskozite ölçüm döner çarkını kullanır (26) (27) (28). Pikap bobinleri, dönme hızının ölçülmesine izin verir. Bilye, genellikle yaklaşık saniyede 400 devir olarak verilen dönüş hızına ulaştığında, enerji verme işlemi durur ve gaz sürtünmesinden dolayı yavaşlama meydana gelir. Dönüş hızındaki düşüş, zamana bağlı olarak ölçülür. Buhar basıncı, çelik bilyenin basınca bağlı yavaşlamasından anlaşılır. Tavsiye edilen aralık 10^{-4} ila 0,5 Pa'dır.

1.5.8.2. Düzenek

Deney kurulumunun şematik çizimi Şekil 11'de gösterilmektedir. Ölçme başlığı, 0,1 °C içerisinde ayarlanmış sabit sıcaklık ile çevrelenmiş bir bölüm içine yerleştirilir. Numune kabı da 0,1 °C içerisinde ayarlanmış ayrı bir çevrelenmiş bölüme yerleştirilir. Kurulumun diğer bütün parçaları, kondansasyonu (yoğuşma) engellemek için yüksek sıcaklıkta muhafaza edilir. Düzeneğin tamamı yüksek vakum sistemine bağlanır.



A: Döner çark sensör başlığı
B:Örnekleme hücresi
C: Termostat
D: Vakum hattı (turbo pompası)
E: Hava termostatı

Şekil 11

2. VERİ VE RAPORLAMA

2.1. Veri

Daha önceki yöntemlerden herhangi biri ile buhar basıncı en az iki sıcaklık için belirlenmelidir. Buhar basınç eğrisinin doğrusallığını kontrol etmek için 0 ila 50 °C aralığında üç ya da daha fazla tercih yapılır. Efüzyon yöntemi (Knudsen hücresi ve izotermal termogravimetri) ve gazın doygun hale getirilmesi yöntemi olması durumunda, sıcaklık aralığının ölçülmesi için 0 ila 50 °C yerine 120 ila150 °C tavsiye edilir.

2.2. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan yöntem,
- maddenin kesin özelliği (kimlik ve safsızlık) ve eğer yapılmış ise ön saflaştırma aşaması,
- en az iki buhar basıncı ve sıcaklık değeri — tercihen üç ya da daha fazla — 0 ila 50 °C (ya da 120 ila 150 °C) aralığında olması gereken,
- eğer seçilen yönteme göre teknik olarak mümkün ise, sıcaklıklardan en az biri 25 °C'de ya da altında olmalı
- bütün orijinal veriler,
- 1/T eğrisine karşı log p,
- 20 ya da 25 °C'de tahmin edilen buhar basıncı

Eğer bir geçiş (durum değişimi, bozunma) gözlemlenir ise aşağıdaki bilgiler dikkate alınmalıdır:

- değişimin özelliği,
- atmosferik basınçta değişimin meydana geldiği sıcaklık,
- geçiş sıcaklığının 10 ve 20 °C altındaki ve bu sıcaklığın10 ve 20 °C üzerindeki (eğer geçiş katıdan gaza değil ise) buhar basıncı.

Sonuçların yorumlanması için, özellikle maddenin safsızlığı ve fiziksel durumu ile ilgili olan bütün bilgiler ve notlar rapor edilmelidir.

3. KAYNAKLAR

(1) Official Journal of the European Communities L 383 A, 26-47 (1992).
(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B.,andVodar, B., Eds., Butterworths, London.
(3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed.,Vol. I, Part I. Chapter IX, InterscincePubl., New York.
(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
(5) NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrialuse — Determination of vapour pressure of solids and liquids with in a range from 10–1 to 105 Pa — Static method.
(6) ASTM D 2879-86, Standard test yöntem for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemicalproductsforindustrialuse — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10–3 to 1 Pa — Vapour pressure balance method.
(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.
(9) Ambrose, D.,Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.
(10) Schmuckler, M.E.,Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vaporpressures of sulfonylureaherbicides; Pest Management Science56, 521-532.
(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), ThePesticide Manual, Twelfth Edition (2000).
(12) Friedrich, K.,Stammbach, K., Gaschromatographicdetermination of small Vapor pressures determination of thevapour 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 twentynine halogenateddibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.
(15) Gückel, W.,Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method forDetermining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science4 (1973) 137-147.
(16) Gückel, W.,Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining theVolatility 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 Yöntem forDeterminingtheVolatility 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 IngredientsUsed in CropProtection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; PesticideScience 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 Micro Extraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.
(20) Tesconi, M.,Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512-20.
(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81st ed. (2000), Vapour Pressure in theRange — 25 °C to 150 °C.
(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).
(23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC. (24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.
(24) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.
(25) Messer G.,Röhl, P., Grosse G., andJitschin 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.
(26) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

Ek-I

Tahmin Yöntemi

GİRİŞ

Tahmin edilen buhar basıncı değerleri:

— uygun deney yöntemlerinin belirlenmesi için,
— teknik nedenlerden dolayı deney yönteminin uygulanamadığı durumlarda bir tahmin ya da limit değer sağlamak için

kullanılabilir.

Tahmin yöntemi

Sıvı ve katıların buhar basıncı, değiştirilmiş Watson bağıntısı kullanarak tahmin edilebilir (a). Gerekli olan tek deney verisi normal kaynama noktasıdır. Yöntem, 10^5 Pa ila 10^{-5} Pa basınç aralığının üzerinde uygulanabilir.

Yöntem hakkında detaylı bilgi "Kimyasal Özellik Tahmin Yöntemleri El Kitabı"nda (b) verilmektedir. Ayrıca bakınız OECD Çevresel Monograf No.67 (c).

Hesaplama prosedürü

Buhar basıncı aşağıdaki gibi hesaplanır:

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

Burada:

T	=	ilgi sıcaklık
T_b	=	normal kaynama noktası
P_{vp}	=	T sıcaklığındaki buhar basıncı
ΔH_{vb}	=	buharlaşma ısısı
ΔZ_b	=	sıkıştırılabilirlik faktörü (tahmin edilen 0,97)
m	=	ilgi sıcaklıkta fiziksel duruma bağlı ampirik (deneysel) faktör

Ayrıca,

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

Burada, K_F, maddenin polaritesinin göz önünde bulundurulduğu ampirik faktördür. Birçok bileşik çeşidi için K_F faktörleri referansta (b) listelenmiştir.

Çoğu zaman indirgenmiş basınçta kaynama noktasının verildiği veriler ulaşılabilirdir. Bu gibi

durumlarda buhar basıncı aşağıdaki gibi hesaplanır:

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

Burada, T_1; indirgenmiş P_1 basıncında kaynama noktasıdır.

RAPOR

Tahmin yöntemi kullanıldığında, rapor hesaplamanın kapsamlı bir dokümantasyonunu içerir.

KAYNAKLAR

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.
(b) Lyman, W.J.,Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of ChemicalPropertyEstimationMethods, McGraw-Hill.
(c) OECD EnvironmentalMonograph No.67. Application of Structure-Activity RelationshipstotheEstimation of PropertiesImportant in ExposureAssessment (1993).

A.5 YÜZEY GERİLİMİ

1. YÖNTEM

Tarif edilen yöntemlerin çoğu OECD Test Dokümanına dayanır(1). Temel ilkeler kaynak (2)'dedir.

1.1. Giriş

Tanımlanan yöntemler sulu çözeltilerin yüzey gerilimlerinin ölçümünde uygulanır.

Bu testi uygulamadan önce maddenin suda çözünürlüğü, yapısı, hidroliz özellikleri, misel (elektriksel yüklü partikül) oluşumu için kritik konsantrasyonu gibi ön bilgilere sahip olmak yararlıdır.

Tanımlanan yöntemler saflık dereceleriyle ilgili herhangi bir sınırlama olmaksızın pek çok kimyasal madde için uygulanabilir.

Halka tansiyometre (gerilme ölçer) yöntemiyle yüzey gerilimi ölçümü sulu çözeltilerden dinamik viskozitesi yaklaşık 200 mPa s in altında olanlarla sınırlıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Yüzey alanı birimi başına düşen serbest yüzey entalpisi yüzey gerilimi olarak bilinir.

Yüzey gerilimi:

N/m (SI birimi) veya

mN/m (SI alt birimi) olarak ifade edilir.

1 N/m = 103 din /cm

1 mM/m = 1 din/ cm (artık kullanılmayan cgs sistemine göre)

1.3. Referans maddeler

Yeni bir maddenin incelendiği her durumda referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Yöntemin çalışabilirliliği zaman zaman kontrol etmek amacıyla kullanılırlar ve diğer yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarlar.

Yüzey gerilimiyle ilgili geniş bir aralığa sahip olan referans maddeler, kaynak 1 ve 3'te belirtilmiştir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Yöntemler, ölçüm kabında incelenmekte olan sıvının yüzeyine temas eden germe veya halkaya, onu bu yüzeyden ayırabilmek veya kıyısından yüzeyle temas ettiği plaka üzerinde oluşan filmi germek için, dikey olarak uygulanması gereken maksimum kuvvetin ölçümüne dayanır.

Suda en az 1 mg/l konsantrasyonunda çözünen maddeler, sıvı çözeltilerde tek konsantrasyonda test edilirler.

1.5. Kalite kriterleri

Bu yöntemlerin çevresel değerlendirmeler için gerekli olan yöntemlerden çok daha fazla kesinliği vardır.

1.6. Test yönteminin tanımlaması

Maddenin çözeltisi damıtık su içinde hazırlanır. Çözeltinin derişimi maddenin sudaki çözünürlüğünün % 90 doygunluğa ulaşmış hali olmalıdır. Derişim 1 g/l'yi geçerse, test için 1 g/l derişimi kullanılmalıdır. 1 mg/l'den daha az suda çözünürlüğü olan maddelerin test edilmesine gerek yoktur.

1.6.1. Plaka yöntemi

TS EN 14370 ve NF T 73–060 (Yüzey aktif ajanlar-sıvı filmler yerleştirerek yüzey geriliminin belirlenmesi) 'ne bakınız.

1.6.2. Germe yöntemi

TS EN 14370 ve NF T 73–060 (Yüzey aktif ajanlar-sıvı filmler yerleştirerek yüzey geriliminin belirlenmesi) 'ne bakınız.

1.6.3. Halka yöntemi

TS EN 14370 ve NF T 73–060 (Yüzey aktif ajanlar-sıvı filmler yerleştirerek yüzey geriliminin belirlenmesi) 'ne bakınız.

1.6.4. OECD uyumlu halka yöntemi

1.6.4.1.Düzenek

Bu ölçüm için ticari olarak piyasada bulunan tansiyometreler (gerginlik ölçerler) uygundur. Tansiyometreler (gerginlik ölçerler) aşağıda yazılanlardan meydana gelir:

- hareketli numune masası
- kuvvet ölçen sistem

Kuvvet ölçen sistem (bakınız şekil) örnek tablosunun üzerine yerleştirilir. Kuvvet ölçümü hataları, bir kütle ölçümünde ±0,1'e karşılık gelen hata sınırıyla $\pm 10^{-6}$ N'u geçmemelidir,. Pek çok durumda, ticari olarak mevcut olan tansiyometrelerin (gerginlik ölçerler) ölçüm dereceleri mN/m olarak kalibre edilmiştir, bu yüzden de yüzey gerilimi 0,1 mN/m hassasiyetle, doğrudan mN /m olarak okunabilir.

1.6.4.1.1. Hareketli Numune Masası

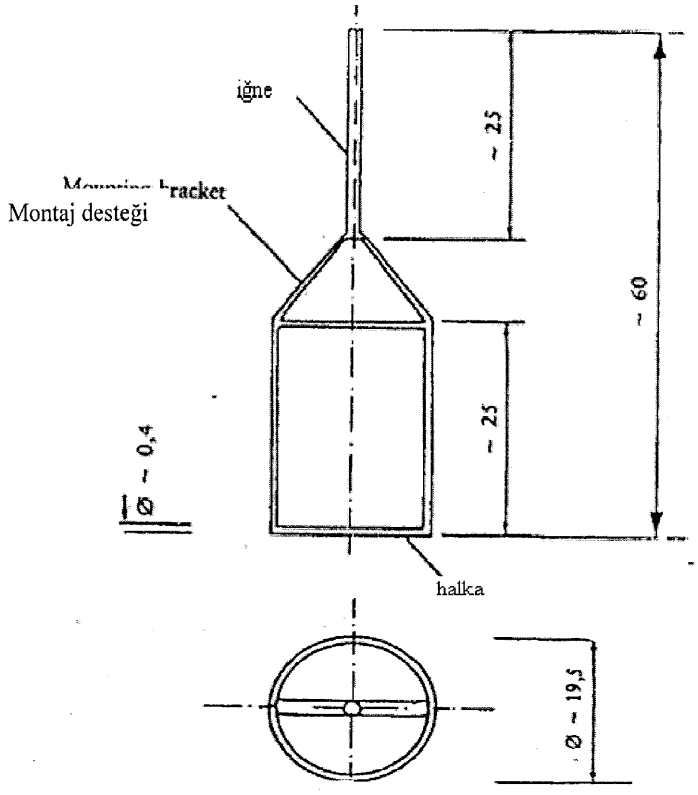
Hareketli Numune Masası test sıvısını içeren sıcaklık kontrolü ölçüm kabına destek olarak kullanılır. Kuvvet ölçen sistem ile birlikte düzeneğe monte edilir.

1.6.4.1.2. Kuvvet ölçme sistemi

Ölçümü yapılacak test çözeltisini taşıyan ölçüm kabı sıcaklık-kontrollü cam bir kap olmalıdır. Ölçüm kabı, ölçüm sırasında test çözeltisinin yüzeyindeki sıvı ve katı fazlar sabit kalacak ve dolayısıyla numune buharlaşmayacak şekilde tasarlanmalıdır. İç çapları 45 mm'den az olmayan silindirik cam kaplar kabul edilir.

1.6.4.1.3. Ölçme gövdesi (halka)

Halka genellikle 0,4 mm kalınlığındaki ve ortalama 60 mm çember çevresine sahip platin iridyum tellerden yapılır. Tel halka metal bir iğneden ve teli tutturan destekten kuvvet oluşturan sistemle bağlantı kurmak için, yatay olarak askıya alınır (bakınız şekil).



Şekil: Ölçme gövdesi (Bütün boyutlar milimetreyle ifade edilmiştir)

1.6.4.2. Düzeneğin hazırlanması

1.6.4.2.1. Temizlik

Cam kaplar çok dikkatli bir şekilde temizlenmelidir. Eğer gerekirse, sıcak kromo-sülfirik asit ve bunu takiben şurup kıvamında fosforik asitle (ağırlıkça % 83'den % 98'e H_3PO_4) yıkanmalıdır, çeşme suyuyla iyice çalkalandıktan sonra bir reaksiyon vermeyinceye kadar iki kez damıtılmış suyla yıkanmalı ve akabinde kurulanmalı veya ölçümü yapılacak sıvının bir miktarıyla çalkalanmalıdır.

Halka önce suda çözünen herhangi bir maddeyi uzaklaştırmak için suyla iyice yıkanmalı, kısa bir süre için kromo-sülfürik asite batırılmalı, reaksiyon vermeyinceye kadar iki kez damıtılmış suyla yıkanmalı ve sonunda da metanol alevinde kısa bir süre ısıtılmalıdır.
Not:
Kromo-sülfürik asit veya fosforik asitle bozulmayan veya çözünmeyen silikon gibi maddelerle kirlenme söz konusu olduğunda uygun bir organik çözücü kullanılarak kirlilik giderilir.

1.6.4.2.2. Düzeneğin kalibrasyonu

Düzeneğin doğru ölçüm yapabildiğinin testi, sıfır noktasının doğrulanması ve ayarlanması dolayısıyla da cihazın mN/m olarak güvenilir olduğunun gösterilmesi anlamına gelir.

Montaj:

Düzenek, örneğin, tansiyometre (gerginlik ölçerler) tabanında uygun bir seviye ile, tabandaki seviyelendirme vidaları ayarlanarak seviyelendirilmelidir.

Sıfır noktası ayarı:

Düzenekteki halka yerleştirildikten sonra ve sıvıya batırılmadan önce tansiyometrenin (gerginlik ölçerlerin) göstergesi sıfıra ayarlanır ve halkanın sıvı yüzeyine paralel olup olmadığı kontrol edilir. Bu amaçla sıvı yüzeyi ayna gibi kullanılabilir.

Kalibrasyonlar:

Gerçek test kalibrasyonu aşağıda yer alan iki işlemle tamamlanabilir:

(a) Kütle kullanımı: halkanın üzerine yerleştirilmiş, bilinen kütleleri 0,1 ve 1,0 gram arasında olan binicilerin kullanıldığı işlemdir. Cihazın tüm okumalarıyla çarpılması gereken kalibrasyon faktörü, Φ_a (1) eşitlik 1'e göre belirlenir.

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

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

burada

m= binicinin kütlesi (g)

g= yerçekimi ivmesi (981 cm s^{-2} deniz seviyesinde)

b= Halkanın çevresinin ortalaması (cm)

σ_a= Halkaya binici yerleştirildikten sonra tansiyometrede (gerginlik ölçerlerde) okunan değer (mN/m)

olarak alınır.

(b) su kullanımı: yüzey gerilimi örneğin 23 °C'de 72,3 mN/m'ye eşit olan saf suyun kullanıldığı işlemdir. Bu işlem, ağırlık kalibrasyonundan daha çabuk tamamlanır fakat suyun yüzey geriliminin yüzey aktif maddelerle kirlenmesi sonucu yanlış olması gibi bir tehlike her zaman bulunmaktadır.

Cihazın tüm okumalarıyla çarpılması gereken kalibrasyon faktörü, ϕ_b eşitlik (2) ye göre belirlenir

.

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

burada

σ_o = suyun yüzey gerilimi (mN/m) için literatürde verilen değer
σ_g = suyun yüzey geriliminin (mN/m) ölçülen değeri

olarak alınır.

Her ikisi de aynı sıcaklıkta.

1.6.4.3.Numunelerin hazırlanması

Gereken konsantrasyonlar kullanılarak ve hiç çözünmemiş madde içermeyecek şekilde, test edilecek maddelerin sulu çözeltileri hazırlanır.

Çözelti sabit sıcaklıkta olmalıdır (±0,5 °C). Çünkü ölçüm kabındaki bir çözeltinin yüzey gerilimi bir süre sonra değişir. Farklı zamanlarda ölçümler yapılıp yüzey geriliminin zamana bağlı fonksiyon eğrisi oluşturulur. Herhangi bir değişiklik gözlenmediğinde dengeye ulaşılmış demektir.

Diğer maddelerden toz ve gaz kirlenmesi ölçüme etki edebilir. Yapılacak iş korunaklı bir alanda yürütülmelidir.

1.6.5. Test koşulları

Ölçümler yaklaşık 20 °C'de yapılmalı ve + 0,5 °C aralığında kontrol edilmelidir.

1.6.6. Testin performansı (verimliliği)

Ölçümü yapılacak çözeltiler dikkatli bir şekilde, köpük oluşmamasına dikkat edilerek temiz bir ölçüm kabına alınır ve daha sonra ölçüm kabı test düzeneğinin tablasının üzerine yerleştirilir. Tablanın üstü ölçüm kabıyla beraber, halka ölçümü yapılacak çözelti yüzeyinin altına dalıncaya kadar kaldırılır. Sonrasında tabla-üstü kademe kademe indirilir ve sonunda, yaklaşık 0,5 cm/dak. hızla, maksimum kuvvete ulaşılıncaya kadar halka yüzeyden ayrılır. Halkaya değen sıvı tabaka halkadan ayrılmamalıdır. Ölçümler tamamlandıktan sonra, halka tekrar yüzeyin altına batırılır ve sabit bir yüzey gerilimi değeri elde edilinceye kadar ölçümlere devam edilir. Çözeltilerin ölçüm kabına aktarılmasından itibaren geçen süre her bir belirleme için kaydedilir. Okumalar sıvı yüzeyden ayrılmak için gereken kuvvet maksimum oluğunda yapılmalıdır.

2. VERİLER

Yüzey gerilimini hesaplamak için, düzenekte mN/m olarak okunan değer önce, kullanılan kalibrasyon yöntemine bağlı olarak Φ_a a veya $\Phi_b$kalibrasyon faktörüyle çarpılmalıdır. Elde edilen değer yaklaşık bir değer olduğundan düzeltme gerektirmektedir.

Harkins ve Jordan (4) halkanın boyutlarına ve sıvının yoğunluğuyla yüzey gerilimine bağlı olan halka yöntemiyle ölçülen yüzey gerilim değerleri için, ampirik olarak düzeltme faktörleri belirlemişlerdir.

Harkins ve Jordan tablolarından her bir ölçüm için ayrı ayrı düzeltme faktörünü belirlemek zahmetli olduğundan, sulu çözeltilerde yüzey gerilimini hesaplamak için düzeltilmiş yüzey gerilimi değerlerini doğrudan tablodan okunması gibi basit bir yöntem kullanılabilir.

(Çizelge değerleri arasında belirtilen değerler arasında kalan okumalar için uyarlama yapılabilir.)

TABLO: ÖLÇÜLEN YÜZEY GERİLİMİNİN DÜZELTMESİ

Yalnızca sulu çözeltiler için, $\rho = 1 g/cm^3$

R= 9,55 (ortalama halka yarıçapı)

r= 0,185 mm (halka teli yarıçapı)

Deneysel değer (mm/m)	Düzeltilmiş değer (mm/m)	
	Ağırlık kalibrasyonu (bakınız 1.6.4.2.2(a))	Su kalibrasyonu(bakınız 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
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	-

Bu tablo Harkins-Jordan düzeltmeleri temel alarak hazırlanmıştır. Su ve sulu çözeltiler için DIN Standard (DIN 53914)'nin (yoğunluk $\rho = 1$ g/cm3) yöntemine benzerdir ve ticari olarak mevcut olan R = 9,55 mm (ortalama halka yarıçapı) ve r = 0,185 (halka tel yarıçapı) boyutlarına sahip halka içindir. Tablo yüzey-gerilim ölçümleri için ağırlıkla veya suyla yapılan kalibrasyon sonrasında doğrulanan ölçümleri gösterir.

Alternatif olarak, belirtilen kalibrasyonlar yapılmadan, yüzey gerilimi aşağıdaki formülle hesaplanabilir:

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

burada
F = filmin kırılma noktasında dinamometrede ölçülen kuvvet
R = halkanın yarıçapı
f = düzeltme faktörü (1)
olarak alınır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan yöntem
- kullanılan su veya çözeltinin türü
- maddenin kesin tanımları (tanım ve safsızlıklar)
- ölçüm sonuçları: yüzey gerilimi (okuma) ayrı ayrı okumalar ve aritmetik ortalamaları yanında düzeltilmiş ortalama (donanım faktörü ve düzeltme tablosu dikkate alınarak)
- çözeltinin derişimi
- test sıcaklığı
- kullanılan çözeltinin hazırlanma tarihi, çözeltinin hazırlanması ve ölçümünün yapılması arasındaki süre
- çözeltiyi ölçüm kabına aktardıktan sonra yüzey geriliminin zamana bağlılığının ifadesi
- sonuçlara ilişkin tüm bilgi ve açıklamalar, özellikle de safsızlıklar ve maddenin fiziksel haliyle ilgili olanlar, rapor edilmelidir.

3.2. Sonuçların yorumlanması

Distile suyun yüzey geriliminin 20 ^{0}C'de 72,75 mN/m olduğu göz önüne alınarak, 60 mN/m'den daha az yüzey gerilimi olan maddelerin bu yöntemin koşulları altında yüzey-aktif maddeler olarak düşünülmesi gerekir.

4. KAYNAKLAR

(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. 48,511.
(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

A.6 SUDA ÇÖZÜNÜRLÜK

1. YÖNTEM

Tarif edilen yöntemlerin çoğu OECD Test Dokümanına dayanır(1).

1.1. Giriş

Bu testi uygulamak için maddenin yapısal formülü, buhar basıncı, ayrışma sabiti ve hidrolizi (pH'nın fonksiyonu olarak) gibi ön bilgilere sahip olmak yararlıdır.

Sudaki çözünürlüklerin tamamını kapsayan tek bir yöntem bulunmamaktadır.
Tüm çözünürlük aralığını kapsayan iki yöntem aşağıda tanımlanmıştır, fakat uçucu maddeler için geçerli değildir:
-biri düşük çözünürlüğe sahip saf maddelere (< 10^{-2} gram/ litre), ve suda kararlı maddelere uygulanır, 'kolon elüsyon yöntemi' olarak atıfta bulunulur,
-diğeri daha fazla çözünürlüğe sahip saf maddelere (> 10^{-2} gram/ litre), suda kararlı maddelere uygulanır, 'cam kap yöntemi' olarak atıfta bulunulur.
Test maddesinin sudaki çözünürlüğü safsızlıkların varlığından önemli ölçüde etkilenebilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Maddenin sudaki çözünürlüğü, maddenin verilen sıcaklıkta sudaki doygunluk kütle derişimi olarak tanımlanır. Sudaki çözünürlük birim olarak çözelti hacmi başına düşen kütle ile ifade edilir. SI birimi ise kg/m^3'tür (ayrıca gram/litre de kullanılabilir).

1.3. Referans maddeler

Yeni bir maddenin incelendiği her durumda referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Yöntemin kullanılabilirliliğinin zaman zaman kontrol etmek amacıyla kullanılırlar ve diğer yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarlar.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Örneğin yaklaşık miktarı ve doygunluk kütle derişimine ulaşma süresi basit bir ön-testle belirlenmelidir.

1.4.1. Kolon elüsyon yöntemi

Bu yöntem test maddesinin, test maddesinin fazlasıyla kaplanmış cam boncuk veya kum gibi inert destek maddesiyle yüklenmiş bir mikro kolondan suyla elüsyonuna dayanır. Sudaki çözünürlük elüatın kütle derişimi sabit olduğunda belirlenir. Bu da zamanın bir fonksiyonu olarak derişim platosuyla gösterilir.

1.4.2. Cam kap (flask) yöntemi

Bu yöntemde madde (katıysa toz haline getirilmelidir) test sıcaklığının biraz üzerinde bir sıcaklıkta, suda çözünür. Doygunluğa ulaşıldığında karışım soğutulur ve test sıcaklığında tutulur, dengeye ulaşılıncaya kadar karıştırmak gerekir. Alternatif olarak, eğer uygun

örneklemeyle doygunluk dengesine ulaşılırsa ölçüm doğrudan test sıcaklığında da gerçekleştirilebilir. Daha sonra maddenin çözünmemiş parçacıklar içermemesi gereken, sıvı çözelti içindeki kütle derişimi uygun bir analitik yöntemle belirlenir.

1.5. Kalite kriterleri

1.5.1 Tekrarlanabilirlik

Kolon elüsyon yöntemi için , < % 30 değerler kabul edilebilir; cam kap yöntemi için, < %15 değerler gözlenmelidir.

1.5.2 Duyarlık

Analiz yöntemine bağlıdır, fakat 10^{-6} gram/litre'ye kadar kütle derişimi belirlemeleri yapılabilir.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Test koşulları

Test tercihen, 20 ± 0,5°C sıcaklıkta yürütülür. Çözünürlüğün sıcaklığa bağlı olduğundan şüphe edilirse, (°C başına % 3 den büyük), başlangıç sıcaklığının en az 10°C üzerinde ve altında olmak üzere iki sıcaklık değeri daha kullanılmalıdır. Bu durumda, sıcaklık kontrolü ± 0,1 °C olmalıdır. Seçilen sıcaklık ilgili tüm kısımlarda sabitliğini korumalıdır.

1.6.2. Ön-hazırlık testi

Örneğin yaklaşık olarak 0,1 gramı (katı maddeler toz haline getirilmelidir) 10 ml'lik derecelendirilmiş cam kapaklı mezüre alınır, artan hacimde distile su oda sıcaklığında, aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi ilave edilir.

'x' ml suda 0,1 g çözünür	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Yaklaşık çözünürlük (gram/litre)	> 1000	1000-200	200-100	100-50	50-10	10-1	<1

Belirtilen miktardaki suyun her ilavesinden sonra, karışım 10 dakika boyunca kuvvetlice çalkalanır ve çözünmemiş kısımlar gözle kontrol edilir. Eğer 10 ml suyun ilavesi sonrasında, örnek ya da örneğin bir kısmı çözünmeden kalırsa, deneyin 100 ml'lik mezürde daha fazla hacimde suyla tekrarlanması gerekir. Daha düşük çözünürlüklerde, maddenin çözünmesi için geçen süre, daha uzun olabilir (en az 24 saat olmalı). Yaklaşık çözünürlük, tabloda ilave edilen su miktarının altında verilmiştir. Madde görünür bir şekilde hala çözünmüş değilse, 24 saatten daha fazla –en fazla 96 saat- beklenmelidir veya hangi yöntemin kullanılacağına karar vermek için ilave seyreltme işlemi uygulanmalıdır.

1.6.3. Kolon elüsyon yöntemi

1.6.3.1.Destek maddesi, çözücü ve eluent

Kolon elüsyon yönteminde kullanılacak olan destek maddesi inert olmalıdır. Kullanılabilecek olası maddeler cam boncuk veya kumdur. Test maddesini destek maddesine uygularken, analitik kalitede uygun uçucu bir çözücü kullanılmalıdır. Cam veya kuartz bir düzenekte, iki kere damıtılmış su eluent olarak kullanılmalıdır.

Not:
Organik iyon değiştiriciden doğrudan elde edilen su kullanılmamalıdır.

1.6.3.2.Destek maddesinin yüklenmesi

Destek maddesinin yaklaşık 600 mg'ı tartılır ve 50 ml'lik balon jojeye aktarılır.

Test maddesinin uygun bir miktarı seçilen çözücüde çözünür. Bu çözeltinin uygun bir miktarı da destek maddesine eklenir. Çözücü tamamen buharlaştırılmalıdır. Aksi takdirde, destek maddesinin yüzeyindeki dağılım etkileri nedeniyle sudaki doygunluğuna ulaşılmaz.

Eğer test maddesi yağ olarak veya farklı bir kristal fazında bırakılmışsa destek maddesinin yüklenmesi problemlere, yanlış sonuçlara neden olabilir. Problem deneysel olarak incelenmeli ve detaylar rapor edilmelidir.

Yüklenen destek maddesinin iki saat 5 ml suda ıslanmasına müsaade edilir, daha sonra mikrokolona süspansiyon ilave edilir. Alternatif olarak, kuru yüklenen destek maddesi suyla doldurulan ve yaklaşık iki saatte dengeye ulaşan mikrokolona dökülebilir.

Test işlemi

Maddenin destek maddesinden elüsyonu iki yoldan biriyle yürütülebilir:

-devri-daim pompası (bakınız şekil 1),
-seviyeleme kabı(bakınız şekil 4).

1.6.3.3.Devri-daim pompalı kolon elüsyon yöntemi

Düzenek

Tipik bir sistemin şematik düzenlemesi Şekil 1'de gösterilmiştir. Uygun bir mikrokolon da şekil 2'de gösterilmiştir. Her ne kadar herhangi bir büyüklük kabul edilse de, tekrarlanabilirlik ve duyarlık ölçütlerine uyanlar sağlanmalıdır. Kolon, en az beş kez su yatak hacimli üstboşluk sağlamalı ve en az beş örnek alabilecek kapasitede olmalıdır. Alternatif olarak, eğer safsızlıklarla uzaklaştırılan başlangıçtaki beş yatak hacmiyle yer değiştirmek için takviye çözücü uygulanacaksa boyut küçültülebilir.

Kolon yaklaşık olarak 25 ml/saatlik akış hızını kontrol etme kapasitesi olan bir devir-daim pompasına bağlı olmalıdır. Pompa, politetrafloroetilen borular (P. T. F.E.) ve/veya cam bağlantılarla bağlıdır.

Kolon ve pompa birleştirildiği zaman, akıntı örneklemeyi ve üst boşluğu atmosferik basınç altında dengelemek için gerekenleri sağlamalıdır. Kolon maddesi, aynı zamanda partikülleri süzme görevi de yapan küçük bir parça cam yünüyle (5 mm) desteklenir. Devir-daim pompası peristaltik pompa ya da membran pompası olabilir. (boru materyalinde kirlenme olmadığına ve/veya absorbsiyon gerçekleşmediğine dikkat edilmelidir)

Ölçüm işlemi

Kolon boyunca akış başlatılır. Yaklaşık olarak 25 ml/sa akış hızının kullanılması tavsiye edilir. (tarif edilen kolon için 10 yatak hacmi/sa 'a karşılık gelir.). İlk beş yatak hacmi (minimum) suda çözünen safsızlıkları bertaraf etmek içindir. Bunu takiben,. ±%30'dan daha fazla değişmeyen konsantrasyonlara sahip beş başarılı örnekte de tanımlandığı gibi, devir-daim pompasının denge oluşuncaya kadar tekrar etmesine izin verilir. Bu örnekler birbirlerinden 10 yatak hacmindeki eluent miktarına izin verecek şekilde zaman aralıklarıyla ayrılmalıdır.

1.6.3.4.Seviyeleme kaplı kolon elüsyon yöntemi

Düzenek (bakınız şekil 4 ve 3)

Seviyeleme kabı: Seviyeleme kabının bağlantısı PTFE bağlantı elemanları ile bağlanan zemin cam bağlantı kullanılarak yapılır. Yaklaşık olarak 25 ml/sa akış hızının kullanılması tavsiye edilir. Başarılı eluent kısımları toplanmalı ve seçilen yöntemlerle analiz edilmelidir.

Ölçüm işlemi

Sudaki çözünürlüğün belirlenmesi için konsatrasyonların en az beş birbirini izleyen kısımda sabit olduğu (±%30) orta eluent aralığının kısımları kullanılır.

Her iki durumda da (devir-daim pompası veya seviyeleme kabı kullanılarak) ilk akış hızının yarısı kadar olmak üzere ikinci bir tekrar yapılır. İki tekrarın sonucu da birbiriyle örtüşürse, test başarılıdır. Eğer, daha düşük akış hızı için daha kolay anlaşılan çözünürlük varsa, o zaman iki ardışık tekrarda aynı sonucu verinceye kadar akış hızının yarıya indirilmesine devam edilir.

Her iki durumda da (devir-daim pompası veya seviyeleme kabı kullanılarak) Tyndall etkisi (ışık dağılması) incelemesiyle kolloidal madde varlığı için kısımlar kontrol edilmelidir. Böyle partiküllerin varlığı sonuçları geçersiz kılar ve kolonun süzme özelliği gözden geçirilerek testin tekrarlanması gerekir.

Her bir örneğin pH'sı kaydedilmelidir. Aynı sıcaklıkta ikinci bir seri yapılmalıdır.

1.6.4. Cam kap (flask) yöntemi
1.6.4.1.Düzenek

Cam kap yöntemi için aşağıdaki malzemelere ihtiyaç vardır: :

-normal laboratuar cam malzemeleri ve cihazları
-kontrol edilen sabit sıcaklıklarda çözeltinin karıştırılmasını sağlayan uygun bir cihaz,
-santrifüj (tercihen termostatlı), gerekiyorsa dağıtmalı, ve

-analitik belirlemeler için teçhizat

1.6.4.2.Ölçüm işlemi

İstenilen hacimdeki suyu doyurmak için gerekli olan madde miktarı ön-testlerle tahmin edilir. Gerekli olan su miktarı, analitik yönteme ve çözünürlük aralığına bağlıdır. Madde miktarının beş katı kadar belirlenen madde, santrifüj tüpleri gibi cam tıkaçlarla kapatılabilen cam kapların üçünde de tartılır. Seçilen hacimdeki su her bir kaba ilave edilir ve kaplar sıkıca kapanır. Kapalı kaplar 30 °C'de çalkalanır, bunun için sıcaklığı ayarlanabilen su banyosunun içindeki manyetik karıştırıcı gibi sallama ya da karıştırma cihazı, sabit sıcaklıkta kullanılmalıdır. Birgün sonra kaplardan bir tanesi alınır ve ara sıra çalkalayarak test sıcaklığında 24 saatte yeniden dengeye getirilir. Kapların içindekiler daha sonra test sıcaklığında santrifüjlenir ve test maddesinin derişimi temiz, sıvı fazda, uygun analitik yöntem kullanılarak belirlenir.Diğer iki kap da 30 °C'de başlangıç dengesine ulaştıktan, sırasıyla, 2 ve 3 gün sonra benzer şekilde muamele edilir. En az son iki kaptan elde edilen derişim sonuçları gerekli tekrarlanabilirliği sağlarlarsa, test başarılıdır, eğer 1, 2 ve 3 nolu kaplardan elde edilen sonuçlar artma eğilimi gösterirlerse, tüm test daha uzun denge süreleri kullanılarak tekrarlanmalıdır.

Ölçüm işlemi ayrıca 30 °C'de ön-işlem gerçekleştirilmeden de yapılabilir. Doygunluk dengesinin oluşma hızını tahmin için, örnekleme karıştırma süresinin test çözeltisinin derişimini etkilemeyinceye kadar yapılır.

Her bir örneğin pH'sı kaydedilmelidir.

1.6.5. Analizler

Böyle belirlemeler için maddeye özgü analitik yöntemler tercih edilir, çünkü çözünebilen safsızlıkların küçük miktarları büyük hatalara neden olurlar. Bu yöntemlere örnek olarak gaz veya sıvı kromatografisi, titrasyon yöntemleri, fotometrik yöntemler, voltametrik yöntemler verilebilir.

2. VERİLER

2.1. Kolon elüsyon yöntemi

En az beş ardışık örnekten alınan doygunluk platolarının ortalama değeri her bir tekrar için hesaplanmalıdır. Aynı şekilde standard sapmalar da bulunmalıdır. Sonuçlar, çözelti hacmi başına düşen kütle ile ifade edilmelidir. Farklı akışlar kullanılarak yapılan iki testin ortalaması hesaplanır ve karşılaştırılır. Tekrarlanabilirlik %30'dan az olmalıdır.

2.2. Cam kap (flask) yöntemi

Üç şişe için de ayrı ayrı sonuçlar verilmeli ve sabit olarak addedilen sonuçların ortalamaları alınmalı(%15'den en az tekrarlanabilirlikle) ve birim olarak çözelti hacmi başına düşen kütle ile ifade edilmelidir. Bu durumda, çözünürlük çok yüksekse, (> 100 gram/litre) yoğunluk kullanılarak kütle biriminin hacim birimine çevrilmesi gerekebilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Kolon elüsyon yöntemi

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- ön hazırlık testinin sonuçları
- maddenin doğru tanımlamaları (kimlik ve safsızlıklar)
- her bir örneğin ayrı ayrı derişimleri, her bir örneğin akış hızı ve pH'ı
- her tekrarın doygunluk platformundan en az beş örneğin ortalama ve standard sapmaları,
- iki ardışık, kabul edilebilir tekrarın ortalaması
- doygunluk sırasında suyun sıcaklığı
- uygulanan analizin yöntemi
- kullanılan destekleyici maddenin yapısı
- destek maddesinin yüklenmesi
- kullanılan çözücü
- test ve kullanılan yöntem sırasında maddenin herhangi bir kimyasal kararsızlığının kanıtı
- sonuçların yorumlanmasına ilişkin anlamlı tüm bilgiler, özellikle de safsızlıklar ve maddenin fiziksel özelliklerine ait olanlar.

3.2. Cam kap (flask) yöntemi

Test raporları, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

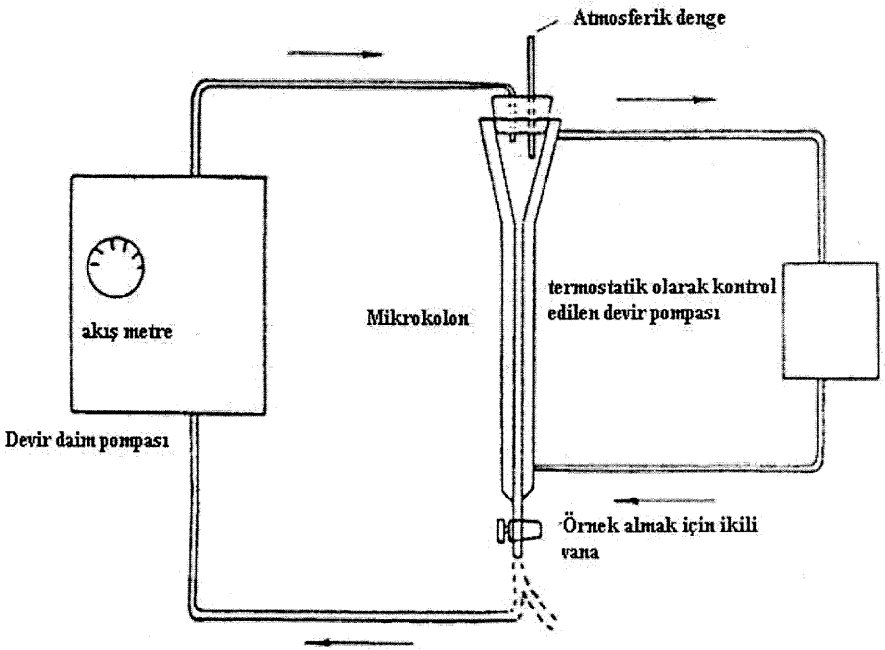
- Ön hazırlık testinin sonuçları
- Maddenin doğru tanımlamaları (kimlik ve safsızlıklar)
- Ayrı ayrı ve her bir şişe için birden fazla değerin belirlendiği durumlarda ortalama analitik belirlemeler,
- Örneğin pH'sı
- Farklı şişeler için kabul edilen değerlerin ortalaması
- Test sıcaklığı
- Uygulanan analitik yöntem
- Test ve kullanılan yöntem sırasında maddenin herhangi bir kimyasal kararsızlığının kanıtı
- Sonuçların yorumlanmasına ilişkin anlamlı tüm bilgiler, özellikle de safsızlıklar ve maddenin fiziksel özelliklerine ait olanlar.

4. KAYNAKLAR

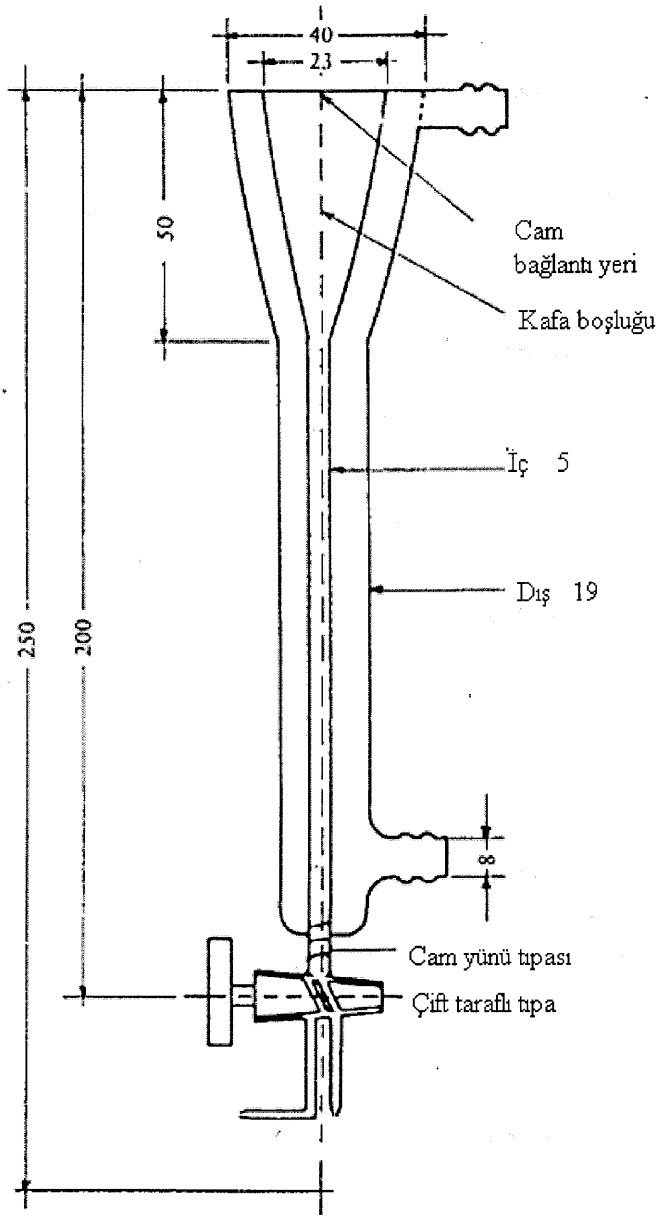
(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.

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

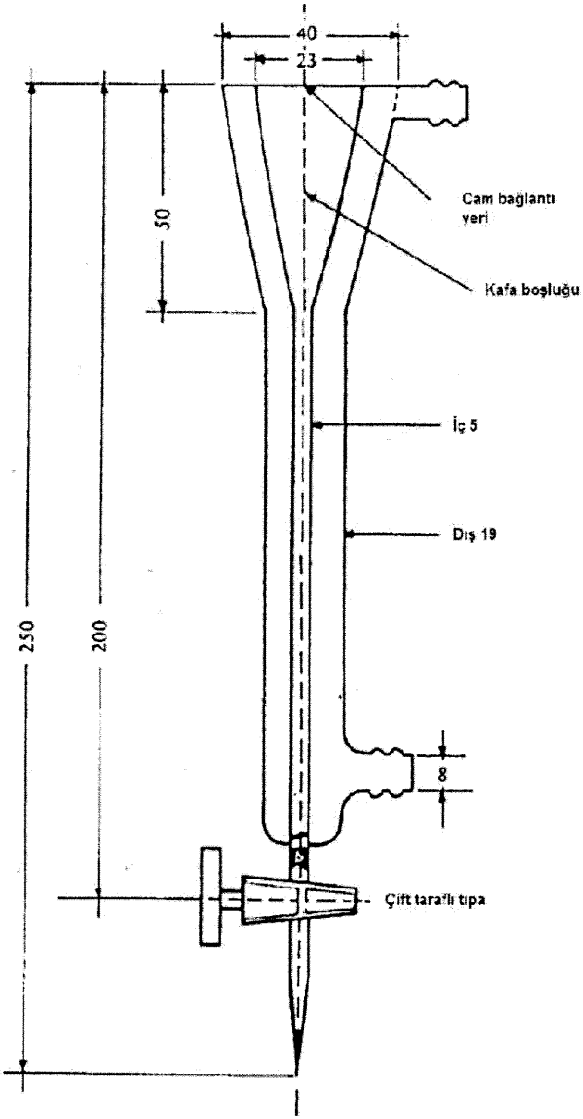
(3) NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use -Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility -Flask method



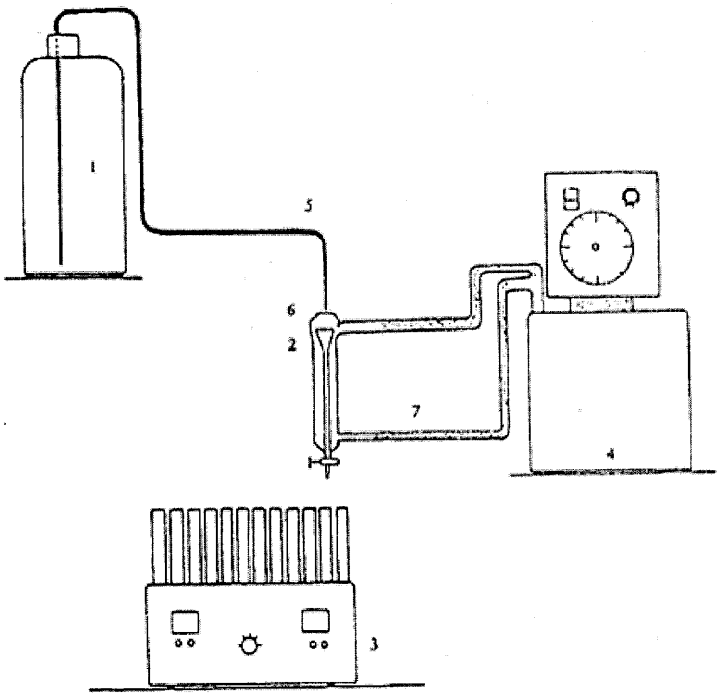
Şekil 1: Devir-daim pompası ile kolon elüsyonu yöntemi



Şekil 2: Tipik bir mikrokolon (tüm boyutlar milimetre olarak)



Şekil 3: Tipik bir mikrokolon (tüm boyutlar milimetre olarak)



1= Seviye Düzenleyici kap (örneğin,2.5 litre cam kap)
2= Kolon (şekil 2'e bak)
3= Kısım Toplayıcı
4= Termostat
5= Teflon Boru
6= Cam Bağlantı Yeri
7= Su Hattı (kolon ve termostat arasında, iç çapı yaklaşık 8m)

Şekil 4: Seviyeleme kaplı kolon elüsyon yöntemi

A.8 DAĞILMA KATSAYISI

1. YÖNTEM

Tarif edilen 'çalkalama cam balon' yöntemi OECD Test Dokümanına dayanır(1).

1.1. Giriş

Bu testi uygulamak için maddenin yapısal formülü, dağılma sabiti, suda çözünürlük ve hidroliz, n-oktanol çözünürlüğü ve yüzey gerilimi gibi ön bilgilere olmak yararlıdır.

Ölçümler, iyonize olabilen maddeler üzerinde, sadece iyonize olmayan durumlarında (serbest asit veya serbest baz), pH'ı pK değerinin en az 1 pH birimi altında (serbest asit) veya üzerinde (serbest baz) olan uygun tampon kullanılarak yapılmalıdır.

Bu yöntem iki ayrı işlemden meydana gelir: Çalkalama cam balon yöntemi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC). İlki, log Pow değerinin (tanımlar için aşağıya bakınız) –2-4, ikincisi ise 0-6 arasına düştüğü durumlarda uygulanır. Her iki deneysel işlemin uygulanması durumunda da ilk olarak dağılma katsayısı ön tahmin olarak elde edilmelidir.

Cam balon çalkalama yöntemi aslında sadece n-oktanol ve suda çözünen saf maddelere uygulanır. Yüzey aktif maddelere uygulanabilir değildir (hesaplanmış bir değer veya tahmini n-oktanol ve suyun çözünürlüğünün biliniyor olması gerekir).

HPLC yöntemi, kuvvetli asit ve bazlara, metal komplekslere, yüzey-aktif maddelere veya eluent'le reaksiyona giren maddelere uygulanmaz. Bu maddeler için, hesaplanmış bir değer veya tahmini n-oktanol ve suyun çözünürlüğünün biliniyor olması gerekir.

HPLC yöntemi, test maddesindeki safsızlıklara çalkalama cam balon yönteminden daha az duyarlıdır. Yine de, bazı durumlarda safsızlıklar sonuçların yorumlanmasını zorlaştırır çünkü pik tayinini belirsizleşir. Ayrılmamış bir bant veren karışım için log P'nin üst ve alt sınırları belirtilmelidir.

1.2. Tanım ve birimler

Dağılma katsayısı (P), biribirleri ile büyük oranda karışmayan iki çözücü içeren ikili faz sisteminde çözülen bir maddenin denge derişimlerinin oranı (ci) olarak tanımlanır. n-oktanol ve su durumunda:

$$P_{ow} = \frac{c_{n\text{-oktanol}}}{c_{su}}$$

Dağılma katsayısı (P), bundan dolayı iki derişim değerinin oranıdır ve genellikle 10 tabanlı logaritma (log P) şeklinde verilir.

1.3. Referans maddeler

Çalkalama cam balon yöntemi
Yeni bir maddenin incelendiği her durumda referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Yöntemin kullanılabilirliliğini zaman zaman kontrol etmek amacıyla kullanılırlar ve diğer yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarlar.

HPLC yöntemi

Bir bileşiğin ölçülen HPLC verilerinin P değeriyle ilişkilendirilmesi için, log P'ye karşı kromatografik veriler olacak şekilde 6 referans noktalı bir kalibrasyon grafiği oluşturulmalıdır. Bu grafik kullanıcının uygun referans maddelerinin seçmesi içindir. Mümkün olduğunca, en az bir referans maddesinin Pow değeri, test maddesinin Pow değerinin üzerinde; bir diğerininki ise test maddesinin Pow değerinin altında olmalıdır. 4'ten küçük olan log P değerleri için kalibrasyon, cam balon çalkalama yönteminden elde edilen verilere dayanarak yapılabilir. 4'ten büyük olan log P değerleri için kalibrasyon, sonuçlar hesaplanan değerlerle örtüşüyorsa geçerliliği tespit edilmiş literatür değerlerinden elde edilen verilere dayanarak yapılabilir. Daha iyi doğruluk için, tercihen test maddesine yapısal olarak benzeyen maddeler, referans bileşikler olarak tercih edilir.

Pek çok kimyasal grupları için kapsamlı log Pow listeleri mevcuttur(2)(3). Eğer yapısal olarak ilgili bileşiklere ait dağılma katsayısı verileri yoksa, diğer referans maddelerle oluşturulan daha genel bir kalibrasyon kullanılabilir.

Tavsiye edilen referans maddeler ve Pow değerleri Ek-II'de verilmiştir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

1.4.1. Çalkalama cam balon yöntemi

Dağılma katsayısını belirlemek için, sistemde birbiriyle etkileşen bütün bileşenlerin dengeye ulaşması gerekir ve iki fazda da çözünen maddelerin derişimleri belirlenmelidir. Bu konuda yapılan literatür çalışmalarından birinin bu sorunu çözmek için, iki fazın tam karışımını fazların birbirlerinden ayrılmasının takip ettiği ve incelenen maddenin denge derişimi belirlendiği, bazı farklı tekniklerin kullanılabileceğine dikkat çekilmiştir.

1.4.2. HPLC yöntemi

HPLC, silikaya kimyasal olarak bağlı uzun karbon zincirleri (ör. C8, C18) içeren ticari olarak mevcut olan katı fazla doldurulmuş analitik kolonlarda gerçekleştirilir. Böyle kolonlara enjekte edilen kimyasallar kolon boyunca hareketli faz ve hidrokarbon durgun faz arasındaki farklı dağılma derecelerine bağlı olarak farklı hızlarda hareket ederler. Kimyasal karışımları hidrofobikliklerine-suda çözünenler önce, yağda çözünenler de en son-, hidrokarbon-su dağılım katsayılarının oranlarına göre çözücüyle sürüklenir. Böylece ters fazlı bir kolondaki alıkonma zamanı ve n-oktanol/su dağılım katsayısı arasındaki ilişki saptanmış olur. Dağılım katsayısı ifadede yer alan kapasite faktörü k, ile bulunur.

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

Burada;
t_r = test maddesinin alıkonma zamanı
t_o = bir çözücü molekülünün kolondan geçmesi için gereken ortalama zaman (ölü-zaman). Nicel analitik yöntemlerine gerek yoktur, sadece sürüklenme zamanlarının belirlenmesi gereklidir.

1.5. Kalite kriterleri

1.5.1. Tekrarlanabilirlik

Cam balon çalkalama yöntemi
Dağılma katsayısının doğruluğunu garantilemek için üç farklı test koşulu altında eş tayin yapılmalıdır. Bu şekilde belirlenen madde miktarı ve çözücü hacimlerinin oranları değişebilir. Genellikle logaritmik olarak ifade edilen dağılım katsayısının belirlenen değerleri ±0,3 log birimi aralığına düşmelidir.

HPLC yöntemi
Ölçümlerdeki güvenilirliği artırmak için, iki tekrar tayin yapılmalıdır. Ayrı ayrı ölçümlerden türetilen log P değerleri ±0,1 log birimi aralığına düşmelidir.

1.5.2. Duyarlılık

Cam balon çalkalama yöntemi
Yöntemin ölçüm aralığı, analitik işlemin tayin sınırıyla belirlenir. Bu şekilde, çözünen maddenin derişiminin her iki fazda da 0,01 mol/litreden daha fazla olmadığı durumlarda, (-2)-4 aralığındaki (bazen bu aralık 5'e kadar çıkabilir) log Pow değerleri hesaplanabilir.

HPLC yöntemi
HPLC yöntemi, dağılım katsayılarının 0-6 log Pow aralığında tahmin edilmesine izin verir. Normalde, bir bileşiğin dağılma katsayısı cam balon çalkalama değerinin ±1 log birimi içinde tahmin edilebilir. Tipik karşılaştırmalar literatürlerden bulunabilir (4)(5)(6)(7)(8). Daha yüksek doğruluğa korelasyon çizimlerinin yapısal olarak ilişkili referans bileşiklere dayandırıldığında ulaşılabilir (9).

1.5.3. Özgünlük

Cam balon çalkalama yöntemi
Nernst Dağılım Kanunu seyreltik çözeltiler için sadece sabit sıcaklık, basınç ve pH'da uygulanır. Tam olarak iki saf çözücü arasında dağılan bir saf maddeye uygulanır. Eğer aynı anda bir veya iki fazda da farklı çözünen maddeler meydana gelirse bu durum sonuçları etkileyebilir.

Çözünen moleküllerin dağılması veya bir araya gelmesi, Nernst Dağılım Kanunundan sapmalara neden olur. Böyle sapmalar, dağılma katsayısının çözeltinin derişimine bağlı olması etkisiyle tanımlanır.

Birden çok denge söz konusu olduğu için, bu test yöntemi herhangi bir düzeltme olmadan, iyonlaşan bileşiklere uygulanmamalıdır. Bu tür bileşikler için su yerine tampon çözelti kullanılması göz önünde bulundurulmalıdır. Tampon çözeltinin pH'sı pKa'dan en az 1 pH birimi kadar farklı olmalıdır ve bu pH'nın ortam için olması akılda tutulmalıdır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Dağılma katsayısının ön-tahmini

Dağılma katsayısı tercihen bir hesaplama yöntemi kullanılarak (bakınız Ek-I) veya uygunsa test maddelerinin saf çözücülerdeki çözünürlük oranlarından hesaplanır (10).

1.6.2. Cam balon çalkalama yöntemi

1.6.2.1. Hazırlık

n-Oktanol: Dağılma katsayısının belirlenmesi oldukça yüksek saflıktaki analitik derecede saf belirteçlerle yapılmalıdır.

Su: su, cam veya kuartz aletlerde bir veya iki defa damıtıldıktan sonra kullanılmalıdır. Doğrulanmışsa iyonlaşan bileşikler için, su yerine tampon çözeltiler kullanılmalıdır.

Not:
Doğrudan iyon değiştiricisinden alınan su kullanılmamalıdır.

1.6.2.1.1. Çözücülerin ön-doygunlaştırma işlemi

Dağılma katsayısı bulunmadan önce, çözücü sisteminin fazları deney sıcaklığında çalkalanarak karşılıklı olarak doyurulur. Bunu yapmak için her birinde diğer çözücüden yeterli miktarda bulunan oldukça saf analitik derecede iki büyük n-oktanol veya su stok şişesini 24 saat boyunca mekanik bir karıştırıcıda çalkalamak pratik olacaktır. Daha sonra, fazlar ayrılıncaya ve doygunluğa erişinceye kadar bekletilirler.

1.6.2.1.2. Test için hazırlık

İki fazlı sistemin tam hacmi test kabını hemen hemen doldurmalıdır. Böylece buharlaşmaya bağlı madde kaybı önlenmiş olur. Hacim oranı ve kullanılacak madde miktarları aşağıda belirtilenlerle sabitlenir:

- dağılım katsayısının ön değerlendirmesi (yukarıya bakınız),
-analitik işlem için gereken test maddesinin en düşük miktarı,
-her iki fazda litre başına 0,01 mol maksimum konsantrasyon sınırlamaları.

Üç tane test yürütülür. Birincisinde n-oktanolün hacminin suyun hacmine oranı hesaplanır; ikincisinde bu oran ikiye bölünür ve sonuncusunda da bu oran ikiyle çarpılır. (örneğin 1:1, 1:2,2:1).

1.6.2.1.3. Test maddesi

Suyla doyurulmuş n-oktanol içinde bir stok çözelti hazırlanır. Bu stok çözeltinin konsantrasyonu, dağılma katsayısının belirlenmesinde kullanılmadan önce hassas olarak hesaplanmalıdır. Bu çözelti kararlılığını koruduğu koşullarda saklanmalıdır.

1.6.2.2. Test koşulları

Test sıcaklığı 20 ile 25 °C aralığında ve ±1 °C 'de sabit tutulmalıdır.

1.6.2.3. Ölçüm işlemi

1.6.2.3.1. Dağılım dengesinin kurulması

İçinde iki çözücüden de gereken, doğru olarak ölçülen miktarlarda bulunan stok çözelti içeren çiftli test kapları, test koşullarının her biri için hazırlanmalıdır.

n-oktanol fazları hacimce ölçülmelidir. Test kapları uygun bir çalkalayıcıya konmalı ya da elle çalkalanmalıdır. Santrifüj tüpü kullanılıyorsa, tüplerin çapraz eksenleri boyunca 180° döndürülmesi tavsiye edilen yöntemdir; böylece de sıkışan hava iki fazın içinden yukarı çıkar. Deneyimler göstermiştir ki, dağılım dengesinin oluşması için, bunun gibi 50 dönüş yeterlidir. Emin olmak için, beş dakikada 100 dönüş yapılması tavsiye edilir.

1.6.2.3.2. Faz ayrılması

Gerekli olduğunda, fazları ayırmak için, karışımlar santrifüjlenmelidir. Bu işlem oda sıcaklığındaki bir laboratuvar santrifüjünde yapılmalıdır veya eğer sıcaklık kontrolü olmayan bir santrifüj kullanılıyorsa da santrifüj tüpleri, denge için analizden önce en az bir saat oda sıcaklığında bırakılmalıdır.

1.6.2.4. Analizler

Dağılma katsayısının belirlenmesi için, test maddesinin her iki fazdaki konsantrasyonların da belirlenmesi gerekir. Her bir test koşulu için bütün tüplerdeki her bir fazdan sıvı kısımlar alınır ve seçilen işlemle analizleri yapılır. Her iki fazdaki toplam madde miktarı hesaplanmalı ve başlangıçtaki madde miktarıyla karşılaştırılmalıdır.

Sulu faz, n-oktanol kalıntılarının bulunma riskini en aza indiren bir işlemle alınmalıdır. Su fazından örnek almak için, çıkarılabilir bir iğnesi olan cam şırınga kullanılabilir. Şırınga başlangıçta kısmen havayla doldurulmalıdır. İğne n-oktanol tabakasına daldırılırken hava da yavaşça dışarı atılır. Yeterli hacimdeki sulu faz şırıngaya alınır, şırınga çözeltiden çabucak uzaklaştırılır ve iğne çıkartılır. Şırınganın içeriği daha sonra sulu örnek olarak kullanılabilir. İki ayrı fazın derişimi tercihen maddeye özgü bir yöntemle belirlenmelidir. Örnek alınacak analitik yöntemler;

-fotometrik yöntemler,
-gaz kromatografisi,
-yüksek performanslı sıvı kromatografisidir.

1.6.3. HPLC yöntemi

1.6.3.1. Hazırlık

Düzenek

Titreşimsiz çalışan pompalı bir sıvı kromatograf ve uygun bir tespit cihazı gereklidir. Enjeksiyon döngülü bir enjeksiyon vanası kullanılması tavsiye edilir. Durgun fazdaki polar grupların varlığı HPLC kolon verimini ciddi bir şekilde azaltabilir. Bundan dolayı durgun fazlar minimum yüzde polar gruplara sahip olmalıdır (11). Ticari olarak mikropartiküllü tersfaz dolgulu veya hazır-dolgulu kolonlar kullanılabilir. Enjeksiyon sistemi ve analitik kolon arasına bir koruyucu kolon yerleştirilebilir.

Hareketli faz

Elute çözücüsünü hazırlamak için HPLC de kullanılan saflıkta metanol ve HPLC de kullanılan saflıkta su kullanılır, kullanmadan önce çözeltinin gazı giderilir. İzokratik elüsyon uygulanmalıdır. Minimum su içeriği %25 olan metanol/su oranları kullanılmalıdır. 3:1 (v/v) metanol-su karışımı, log P 6 olan bileşikleri 1 saat içinde, 1 ml/min. akış hızında çözücüyle sürükleme durumunda başarılıdır. Yüksek log P değeri olan bileşikler ve referans maddeleri için, hareketli fazın polaritesi veya kolon uzunluğunun azaltılması elüsyon süresinin kısaltılması için gereklidir.

n-oktanoldeki çözünürlüğü çok az olan maddeler HPLC yönteminde anormal bir şekilde düşük log Pow values değerleri gösterme eğilimindedirler; böyle bileşiklerin pikleri çözücü piklerin önünde görülür. Bu da muhtemelen; ayrılma işleminin gerçekleşmesinin dengeye ulaşmak için HPLC'deki normal ayrılma süresinden daha fazla olmasına bağlıdır. Akış hızını azaltmak ve/veya metanol/su oranını düşürmek güvenilir bir değer elde etmek açısından etkili olabilir.

Test ve referans bileşiklerinin belirlenebilmeleri için hareketli fazın içinde yeterli konsantrasyonda çözünür olmaları gerekmektedir. Sadece istisnai durumlarda, metanol-su karışımıyla katkı maddeleri kullanılabilir, çünkü katkı maddeleri kolonun özelliklerini değiştirir. Katkı maddeli kromatogramlar için, aynı tip fakat farklı bir kolon kullanmak zorunludur. Eğer metanol-su uygun değilse, etanol-su veya asetonitril-su gibi diğer organik çözücü-su karışımları kullanılabilir.

Eluent pH'ı iyonlaşabilen maddeler için kritiktir. Kolonun çalışma pH aralığı içinde olmalıdır o da genellikle 2-8 arasındadır. Tamponlama tavsiye edilir. Tuz çökmesinden kaçınmaya ve bazı organik faz/tampon karışımlarının neden olduğu kolon bozulmasına karşı dikkat edilmelidir. pH'ı 8'in üzerinde olan silika bazlı durgun fazlarla yapılan HPLC ölçümleri tavsiye edilmez, baz kullanımından dolayı hareketli faz kolonun performansında hızlı bozulmaya neden olabilir.

Çözünen maddeler

Referans maddeler olabildiğince saf olmalıdır. Test için veya kalibrasyon amaçlı kullanılan maddeler mümkünse hareketli fazda çözünmelidir.

Test koşulları

Ölçümler sırasında sıcaklık ±2 K'dan daha fazla değişmemelidir.

1.6.3.2. Ölçüm

t_0 Ölü-zamanının hesaplanması
Ölü-zaman gerek alkilmetil ketonlar gibi homolog seriler gerekse tiyoüre veya formamid gibi alıkonmamış organik bileşikler kullanılarak tayin edilebilir. Homolog seriler kullanarak ölü-zamanın hesaplanması için en az yedi parçalı bir set homolog serinin enjekte edilmesi ve ayrı ayrı alıkonma zamanlarının hesaplanması gerekir. Kabataslak alıkonma zamanları, tr (n c + 1) regresyon denklemindeki tr(n c)'nin, kesişim, a, ve eğim, b, nin bir fonksiyonu olarak çizilir. Aşağıdaki denklemle tayin edilir (nc = karbon atomu sayısı).

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

t_0 ölü zamanı $t_0 = a/(1-b)$ ile verilir.

Kalibrasyon grafiği
Bir sonraki basamak, uygun referans bileşikler için log k değerleri log p'ye karşılık çizilerek korelasyon grafiğini oluşturmaktır. Pratikte, 5-10 set arasında, log p değerleri beklenen aralıkta olan standart referans bileşikler eş zamanlı olarak enjekte edilirler ve tercihen, tespit sistemindeki kayıt yapan integratörle alıkonma zamanları belirlenir. Kapasite faktörlerine ilişkin logaritmik değerler, log k, hesaplanır ve bu değerlerin çalkalama cam balon yöntemiyle belirlenen log p'nin bir fonksiyonu olarak grafik çizilir. Kalibrasyon düzenli aralıklarla, günde en az bir kere, yapılır, bu yüzden kolonun performansındaki olası değişiklikler izin verilebilir hale gelebilir.

Test maddesinin kapasite faktörünün hesaplanması
Test maddesi mümkün olduğunca az bir miktarda hareketli faza enjekte edilir. Alıkonma zamanı belirlenir (iki kere), kapasite faktörü, k, hesaplanır. Referans bileşiklerin korelasyon grafiğinden, test maddesinin dağılım katsayısı interpole edilerek bulunur. Çok düşük ve çok yüksek dağılım katsayıları için ekstrapolasyon gereklidir. Bu durumlarda, regresyon doğrusunun güven sınırına özel önem gösterilmelidir.

2. VERİLER

Çalkalama cam balon yöntemi

Tayin edilen P değerlerinin güncelliği eş zamanlı yapılan iki tayinin ortalamalarının tüm verilerin ortalamasıyla karşılaştırılarak test edilebilir.

3. RAPORLAMA

Test raporları, mümkünse, aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- maddenin tam tanımlanması (tanım ve safsızlıklar),

- yöntemler uygulanabilir olmadığında, (örneğin yüzey aktif maddeler) başlangıçtaki n-oktanol ve suyun çözünürlüklerine dayanarak hesaplanmış bir değer veya tahmin sağlanmalıdır,
- sonuçların yorumlanması, özellikle de safsızlıklar ve maddenin fiziksel haline dair tüm bilgiler ve açıklamalar.

Çalkalama cam balon yöntemi için:
- varsa, yapılan ilk tahmin sonuçları,
- tayin sıcaklığı,
- konsantrasyon belirlemede kullanılan analitik işlemlerin verileri,
- eğer yapılmışsa, santrifüj hızı ve süresi,
- her bir belirleme için, her iki fazda da ölçülen konsantrasyonlar (bu da toplam 12 konsantrasyonun rapor edileceği anlamına gelmektedir),
- test maddesinin ağırlığı, her bir test kabındaki her bir fazın hacmi ve dengeye ulaşıldıktan sonra her iki fazda da yer alan test maddesinin hesaplanan toplam miktarı,
- dağılma katsayısının (P) hesaplanan değerleri ve ortalaması test koşullarının her bir seti için, tüm tayinlerin ortalaması olarak, rapor edilmelidir. Eğer dağılım katsayısının derişime bağlılığıyla ilgili bir öneri varsa not edilmelidir,
- ortalama ile ilgili her bir P değerinin standard sapması rapor edilmelidir,
- bütün belirlemelerden bulunan ortalama P ayrıca logaritmik olarak da ifade edilmelidir. (10 tabanına göre),
- teorik olarak hesaplanan Pow, bu değer hesaplandığında veya ölçülen değer > 10^4 olduğunda,
- deney sırasında kullanılan suyun ve sulu fazın pH'ı,
- eğer tampon çözelti kullanılmışsa, su yerine tampon çözelti kullanımının doğrulanması, tamponların bileşenleri, derişim ve pH'ları, sulu fazın deney öncesi ve sonrasındaki pH'ı.

HPLC yöntemi için:
- varsa, yapılan ilk tahmin sonuçları,
- test ve referans maddeleri ve bu maddelerin saflıkları,
- tayinlerin sıcaklık aralığı,
- tayinlerin yapıldığı pH,
- analitik ve koruyucu kolon, hareketli faz ve belirlemelerin ortalamalarıyla ilgili detaylar,
- alıkonma verileri ve kalibrasyonda kullanılan referans maddelerin literatürdeki log P değerleri,
- regresyon doğrusu ile ilgili detaylar (log P ye karşılık log k),
- test bileşiği için ortalama alıkonma verileri ve interpole edilen log P değeri,
- ekipmanların ve işlem koşullarının tanımları,
- elüsyon şartları,
- kolona verilen test ve referans maddelerinin miktarları,
- ölü-zaman ve nasıl ölçüldüğü.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.
(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) -Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12,219 (1981).
(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247,1.
(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7,675
(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15,787
(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.
(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14,479
(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use -Determination of partition coefficient-Flask shaking method.
(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12,1459
(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525
(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.
(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8,1113.
(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10,382
(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.
(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,
(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base11978.
(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19,615.

Ek-I

Hesaplama/Tahmin Yöntemleri

Giriş

Hesaplama yöntemlerine genel bir giriş, veriler ve örnekler Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) kitabından sağlanabilir.

Hesaplanan log Pow değerleri:

-hangi deneysel yöntemin uygun olduğuna karar vermek (çalkalamalı cam kap aralığı: log Pow: -2 - 4, HPLC aralığı: log Pow: 0 - 6),
-uygun test koşullarının bulunması (örneğin HPLC işlemleri için referans maddeler, çalkalama cam balon yöntemi için n-oktanol/su hacim oranları),
-laboratuvar içi olası deneysel hataların kontrolu
-deneysel yöntemlerin teknik nedenlerle uygulanamaz olduğu durumlarda tahmini-Pow değeri sağlamak
için kullanılabilir.

Tahmin yöntemi

Dağılma katsayısının ön-tahmini

Dağılma katsayısı değeri test maddesinin saf çözücü içindeki çözünürlükleri kullanılarak tahmin edilebilir:

$P_{tahmini}$ = (doygun$_{n\text{-}oktanol}$ konsantrasyon)/(doygun$_{su}$ konsantrasyon)

Hesaplama yöntemleri

Hesaplama Yöntemlerinin Prensibi

Bütün hesaplama yöntemleri moleküllerin düzgün şekilde güvenilir log Pow artışlarının bilindiği uygun alt yapılara ayrılmasına dayanır. Tüm molekülün log Pow değeri daha sonra ilgili parçalarının değerleri toplamı artı molekül içi etkileşimler için mevcut düzeltme faktörlerinin toplamı olarak hesaplanır.

Parçaların sabitleri ve düzeltme terimlerinin listesi mevcuttur (b)(c)(d)(e). Bazıları düzenli olarak güncellenir (b).

Kalite ölçütleri

Genelde, hesaplama yönteminin geçerliliği çalışılacak bileşik karmaşıklaştıkça, azalır. Düşük molekül ağırlıklı ve bir veya iki fonksiyonel grubu olan, basit moleküller söz konusu olduğunda, farklı parçalanma yöntemleri ve ölçülen değerler arasında 0,1-0,3 log Pow birimi sapma beklenebilir. Daha karmaşık moleküller söz konusuysa, hata aralığı daha fazla olabilir. Bu durum hidrojen bağları gibi molekül içi etkileşimlerin belirlenebilme kabiliyeti, düzeltme terimlerinin doğru kullanımı (bilgisayar yazılım programı CLOGP -3 ile daha az problem yaşanır) yanında parça sabitlerinin güvenilirliğine ve elde edilebilirliğine bağlıdır (b).

İyonlaşan bileşikler söz konusuysa, iyonlaşma yükü veya derecesinin doğru ele alınması önemlidir.

Hesaplama işlemleri

Hansch π Yöntemi
Orijinal hidrofobik yerdeğiştirme sabiti, π, Fujira ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur(f), sabit:

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

ile ifade edilir.

$P_{ow}(PhX)$ aromatik bir türevin dağılma katsayısı ve $P_{ow}(PhH)$ ana bileşiğin dağılma katsayısı olarak alınır.

(örn. $\pi_{Cl} = \log P_{ow}(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$)

Tanıma göre, π-yöntemi öncelikle aromatik yer değiştirmelere uygulanır. Çok sayıdaki yer değiştirme için π-değerleri tablo haline getirilmiştir (b)(c)(d). Aromatik moleküller ve alt-yapılar için log Pow değeri hesaplamada □-değerleri kullanılır.

Rekker Yöntemi
Rekker'e göre (g) log Pow değeri aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_j + \sum_J \text{ (etkileşim terimleri)}$$

f_j farklı moleküler parça sabitlerini ve a_i, araştırılan moleküldeki oluşma sıklıklarını ifade eder. Düzeltme terimleri, tek bir sabitin integral çarpımı olarak ifade edilir, Cm, 'sihirli sabit' olarak da adlandırılır. Parça sabitleri fj ve Cm, 1054 (825 bileşik) deneysel Pow değerinin yer aldığı listeden çoklu regresyon analizi kullanılarak belirlenebilir (c)(h). Etkileşim terimlerinin belirlenmesi literatür (e)(h)(i)'de bahsedilen set kurallarına göre yürütülür.

Hansch-Leo Yöntemi
Hansch ve Leo (c)'ya göre, log P ow değeri:

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

formülüyle hesaplanır.

fi farklı moleküler parça sabitlerini, Fj düzeltme terimlerini ve ai, bj ilgili oluşma sıklıklarını ifade eder. Deneysel Pow değerlerinden elde edilen atomik ve grup parçalanma değerlerinin listesi ve düzeltme terimleri listesi Fj (faktör olarak da adlandırılır) denenerek belirlenir. Düzeltme terimleri, farklı sınıflara ayrılırlar (a)(c). Bu durum bütün kuralları ve düzeltme faktörlerini göz önüne almak için görece karmaşık ve zaman alıcıdır. Yazılım paketleri geliştirilmiştir (b).

Birleştirilmiş yöntem

Kompleks moleküllerin log Pow değerlerinin hesaplanması, eğer molekül daha güvenilir log Pow değerlerinin tablodan (b)(c) veya kendi ölçümlerinden elde edildiği daha büyük alt-yapılara ayrılırsa, geliştirilebilir. Heterosiklikler, antrakinon, azobenzen gibi böyle kısımlar daha sonra Hansch π-değerleriyle ya da Rekker veya Leo parça sabitleriyle birleştirilirler.

Açıklamalar

i) Hesaplama yöntemleri, kısmen veya tamamen iyonlaşan bileşiklere gerekli düzeltme faktörlerini dikkate almanın mümkün olduğu zamanlarda uygulanır.

ii) Eğer molekül içi hidrojen bağlarının varlığı düşünülüyorsa, ilgili düzeltme terimlerinin (yaklaşık. + 0,6 dan + 1,0 log Pow birimlerine) eklenmesi gerekir (a). Bu tür bağların olduğunun gösterilmesi stereo modellerle veya molekülün spektroskopik verileriyle yapılabilir.

iii) Eğer bir kaç tautomerik yapılar varsa, hesaplamalarda en uygun yapı kullanılmalıdır.

iv) Parça sabitleriyle ilgili listedeki değişiklikler dikkatlice takip edilmelidir.

Rapor

Hesaplama/tahmin yöntemleri kullanılırken, test raporu mümkünse aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- maddenin tanımlanması (karışım, safsızlıklar vs.),
- hidrojen bağları gibi olası molekül içi etkileşimlerin, ayrışma, yük ve tautomerizm gibi diğer alışılmadık etkilerin gösterilmesi,
- hesaplama yönteminin tanımı,
- veri tabanlarının tanımlanması ve tedariği,
- parça seçiminin özel durumları,
- açıklamalı hesaplama belgesi.

Kaynaklar

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property EstimationMethods, McGraw-Hill, New York, 1983.
(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Databaseand 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. 71,525.
(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, vol. 14,479.
(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86,5175.
(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, NewYork, 1977,vol.1.
(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12,1459.
(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255,p. 225.

Ek-II

HPLC yöntemi için önerilen referans maddeler

No	Referans Bileşik	Log P_{ow}	pK_a
1	2-Bütanon	0,3	
2	4-Asetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Asetanilid	1,0	
5	Benzilalkol	1,1	
6	p-Metoksifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksi asetik asit	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	Fenilasetonitril	1,6	
12	4-Metilbenzil alkol	1,6	
13	Asetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
	3-Nitrobenzoik asit	1,8	pKa = 3,47
16	4-Kloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzen	1,9	
18	Sinnamik alkol	1,9	
19	Benzoik asit	1,9	pKa = 4,19
20	p-Kresol	1,9	pKa = 10,17
21	Sinnamik asit	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisol	2,1	
23	Metilebenzoat	2,1	
24	Benzen	2,1	
25	3-Metilbenzoik asit	2,4	pKa = 4,27
26	4-Klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloretilen	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etilebenzoat	2,6	
30	2,6-Diklorobenzonitril	2,6	
31	3-Klorobenzoik asit	2,7	pKa = 3,82
32	Toluen	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dikloroanilin	2,8	
35	Klorobenzen	2,8	
36	Alil-fenileter	2,9	
37	Bromobenzen	3,0	
38	Etilbenzen	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diklorobenzen	3,4	
43	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalin	3,6	
45	Fenilbenzoat	3,6	
46	İsopropilbenzen	3,7	
47	2,4,6-Triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenil	4,0	
49	Benzilbenzoat	4,0	
50	2,4-Dinitro-6 sek. bütilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triklorobenzen	4,2	
52	Dodekanoik asit	4,2	
53	Difenileter	4,2	
54	n-Bütilbenzen	4,5	
55	Fenantren	4,5	
56	Floranten	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-Difenilpiridin	4,9	
59	Trifenilamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Düşük log P_{ow} değerine sahip diğer referans maddeler		
	Nikotinik asit	-0,07	

A.9 PARLAMA NOKTASI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu testi uygulamak için maddenin olası alev alma özellikleri hakkında ön bilgiye sahip olmak yararlıdır. Test işlemi, buharları tutuşma kaynaklarıyla yanabilen sıvı maddelere uygulanır. Bu metinde listelenen test yöntemleri sadece ayrı ayrı yöntemlerle belirlenen parlama noktası aralıkları için geçerlidir.

Kullanılacak yöntem seçilirken, madde ve örnek tutucu arasındaki kimyasal reaksiyonların olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Parlama noktası, 101,325 kPa basınca göre düzeltilmiş, sıvının buharlaştığı test yönteminde belirlenen koşullar altında, test kabında bir miktar alev alabilir buhar/ hava karışımı'nın oluştuğu en düşük sıcaklıktır.

Birimi: ^{0}C

t= T- 273,15 (t ^{0}C cinsinden ve T, K cinsinden)

1.3. Referans maddeler

Yeni bir maddenin incelendiği her durumda referans maddelerin kullanılmasına gerek yoktur. Yöntemin çalışabilirliliği zaman zaman kontrol etmek amacıyla kullanılırlar ve diğer yöntemlerin sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarlar.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Madde, test kabına yerleştirilir ve test yönteminde belirtilen test sıcaklığına ısıtılır veya soğutulur. Test sıcaklığında parlayıp parlamadığını anlamak için tutuşma denemeleri gerçekleştirilir.

1.5. Kalite kriterleri

1.5.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, parlama noktası aralığına ve kullanılan test yöntemine bağlı olarak değişir. En fazla 2 ^{0}C'dir.

1.5.2. Duyarlılık

Duyarlılık kullanılan test yöntemine bağlıdır.

1.5.3. Özgünlük

Bazı test yöntemlerinin özgünlüğü belli parlama noktası aralıklarıyla sınırlıdır ve maddeyle ilgili verilere tabidir. (örneğin yüksek viskozite)

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Hazırlıklar

Test maddesi örneği 1.6.3.1. ve/veya 1.6.3.2. 'ye göre testin yapılacağı düzeneğe yerleştirilir. Güvenlik açısından aktif veya toksik maddeler için küçük ebatlı, yaklaşık 2 cm^3, örnek kullanılan yöntemlerin uygulanması tavsiye edilmektedir.

1.6.2. Test koşulları

Alet olabildiğince güvenli olmalı ve taslak olarak serbest pozisyonda yerleştirilmelidir.

1.6.3. Testin performansı

1.6.3.1. Denge yöntemi

Bakınız TS 1753 EN ISO 1516, TS 1754 EN ISO 1523, TS EN ISO 3679.

1.6.3.2. Dengede olmayan yöntem

Abel düzeneği

Bakınız BS 2000 kısım 170, NF M07-011, NF T66-009.

Abel-Pensky düzeneği

Bakınız EN 57, DIN 51755 bölüm 1(5-65 ^{0}C arasındaki sıcaklıklar için), DIN 51755 bölüm 2 (5^{0}C'nin altındaki sıcaklıklar için), NF M07-036.

Tag düzeneği

Bakınız ASTM D 56.

Pensky-Martens düzeneği

Bakınız TS EN ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Açıklamalar

Parlama noktası 1.6.3.2.'deki dengede olmayan yöntemle belirleniyorsa, 0±2 ^{0}C, 21±2 ^{0}C veya 55±2 ^{0}C olarak bulunur. Ancak sonuçlar aynı düzenek kullanılarak denge yöntemiyle doğrulanmalıdır.

Sadece parlama noktası sıcaklığını verebilen yöntemler bildirim için kullanılır.

Çözücüleri de kapsayan viskoz sıvıların (boyalar, sakızlar ve benzerleri) parlama noktasını belirlemek için sadece viskoz sıvıların parlama noktalarını belirlemek için kullanılan düzenek ve test yöntemleri kullanılabilir.

Bakınız TS EN ISO 3679, TS EN ISO 3680, TS 1754 EN ISO 1523, DIN 53213 bölüm 1.

2. VERİLER

3. RAPORLAMA

Test raporları, mümkünse, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- — maddenin eksiksiz olarak teknik özellikleri (tanımı ve safsızlıkları),
- — kullanılan yöntem, olası sapmalarıyla beraber belirtilmelidir.
- — sonuçlar ve sonuçların yorumuyla ilgili ilave açıklamalar.

4. KAYNAKLAR

Kaynak yok.

A.10 ALEVLENİRLİK (KATILAR)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu testi uygulamak için maddenin olası patlayıcı özellikleri hakkında ön bilgiye sahip olmak yararlıdır.

Bu test sadece toz halindeki, tanecikli veya macunumsu maddelere uygulanmalıdır.

Bütün maddeleri değil ama sadece hızlı yananları veya özellikle tehlikeli şekilde yanma özelliği olanları kapsamak adına yalnızca yanma hızı belli bir sınırın çok üzerinde olan maddelerkolay alevlenir olarak düşünülür.

Özellikle, akkorun metal tozlar sayesinde yayıldığı durumlarda yangını söndürme zorluğundan dolayı tehlike söz konusu olabilir. Metal tozları, kaplanılan alan boyunca belli bir zamanda akkorun sıçramasını sağlıyorsa kolay alevlenir olarak değerlendirilmelidirler.

1.2. Tanım ve birimler

Yanma süresi saniyelerle ifade edilir.

1.3. Referans maddeler

Belirtilmemiş.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Madde, 250 mm uzunluğunda kesik olmayan bir şerit veya toz düzeni şekline getirilir ve eğer gaz aleviyle tutuşma, yanan alevin yayılması veya küllenmiş ateş meydana geliyorsa yanma hızını belirlemek için ön tarama testi uygulanır. Belli bir süre içinde yayılma, düzenin 200 mm'nin üzerinde gerçekleşiyorsa, yayılma hızını belirlemek için tam bir test programı uygulanır.

1.5. Kalite kriterleri

Belirtilmemiş.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Ön tarama testi

Madde, yanmayan deliksiz ve düşük ısı iletkenliği olan plaka üzerinde 250 mm uzunluğunda, 20 mm genişliğinde, 10 mm yüksekliğinde, kesik olmayan bir şerit veya toz düzeni şekline getirilir. Minimum 5 mm çapı olan sıcak alev toz düzeninin bir ucuna toz tutuşuncaya kadar veya en fazla 2 dakika uygulanır (metallerin veya metal alaşımlarının tozları için 5 dakika). Düzenin 200 mm'sinde 4 dakikalık test süresi içinde (veya metal tuzları için 40 dakika) yanmanın başlayıp başlamadığı not edilmelidir. Eğer madde 200 mm'lik toz düzeninde 4

dakikalık (veya 40 dakika) test süresi içinde tutuşmaz ve alevli yanma veya içten yanma olarak, yanmanın yayılması gerçekleşmezse, o zaman madde kolay alevlenir olarak düşünülmemelidir ve ilave teste gerek yoktur. Eğer madde 200 mm uzunluğundaki toz düzeninde 4 dakikadan veya metal tozları için 40 dakikadan daha kısa bir sürede yanma yayılıyorsa, aşağıda belirtilen işlem (nokta 1.6.2 ve devamı) gerçekleştirilmelidir.

1.6.2. Yanma hızı testi

1.6.2.1. Hazırlık

Toz halindeki veya granüllü maddeler 250 mm uzunluğunda, iç uzunluğu 10 mm, genişliği 20 mm olan üçgen kesitli kalıbın içine boşluklar kalacak şekilde doldurulur. Kalıbın her iki yanında boylamasına doğru, üçgen kesitin üst kenarını aşarak 2mm çıkıntı yapan yanal sınırlayıcı iki metal plaka monte edilmiştir. Kalıp daha sonra 2 cm yukarıdan katı yüzeyin üzerine bırakılır. Eğer gerekliyse kalıp yeniden doldurulur. Yanal sınırlar daha sonra kaldırılır ve fazla madde kazınır. Yanmayan, gözeneksiz ve düşük ısı iletkenliğine sahip plaka kalıbın üzerine yerleştirilir, düzenek çevrilir ve kalıp kaldırılır.

Macunumsu maddeler yanmayan, gözeneksiz ve düşük ısı iletkenliğine sahip 250 mm uzunluğunda 1 cm^2 kesitinde ip şeklindeki bir plakaya serpiştirilir.

1.6.2.2. Test koşulları

Neme duyarlı maddeler söz konusuysa, madde hazneden alındıktan sonra mümkün olduğunca çabuk uygulanmalıdır.

1.6.2.3. Test performansı

Yığın, hava akımının karşısına gelecek şekilde düzenlenerek davlumbazın içine yerleştirilir. Hava hızı laboratuvara sızan dumanı önleyecek yeterlilikte olmalıdır ve test boyunca değişmemelidir. Düzeneğin etrafına paravan yerleştirilmelidir. Yığını bir ucundan tutuşturan yanıcıdan çıkan alev(en az 5 mm çapında) kullanılır. Yığın 80 mm kadar yandığında ilerideki 100 mm için yanma hızı ölçülür. Her seferinde soğuk temiz bir plaka kullanılarak, bir önce ölçülen pozitif sonuç alınmazsa, test altı defa tekrarlanır.

2. VERİLER

Ön tarama testindeki yanma süresi (1.6.1) ve altı teste (1.6.2.3) göre en kısa yanma zamanı değerlendirme için uygundur.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporları, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

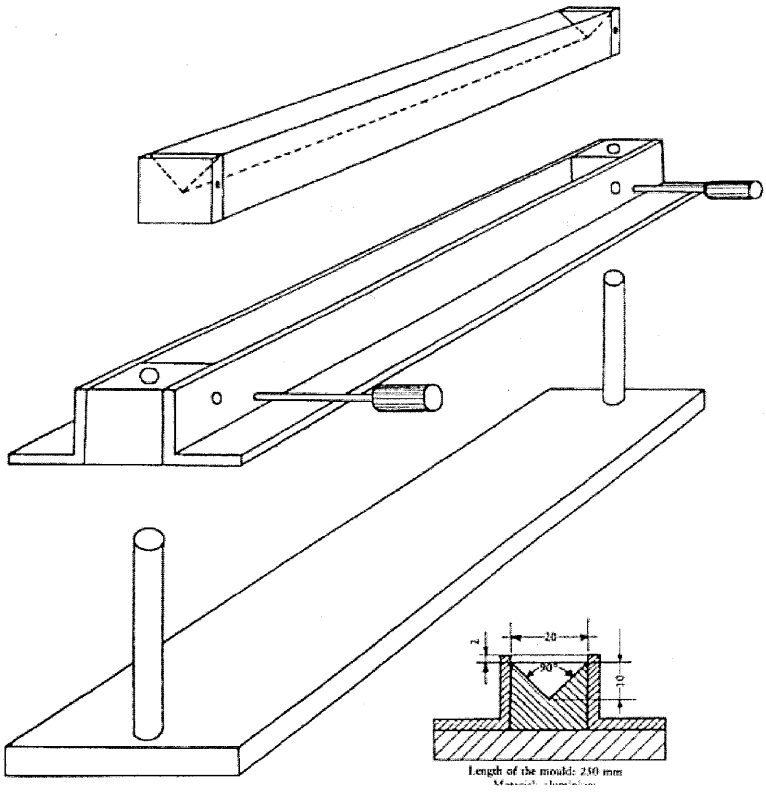
- maddenin eksiksiz olarak teknik özellikleri (kimlik ve safsızlıkları)
- test maddesinin tanımı, nem içeriğini de kapsayan fiziksel hali
- ön tarama testinin ve eğer uygulandıysa yanma hızı testinin sonuçları
- sonuçların yorumuyla ilgili bütün ilave hatırlatmalar

3.2. Sonucun yorumu

1.6.2.'de tanımlanan test işlemine göre uygulanan testlerde yanma süreleri 45 saniyeden daha az olan toz halindeki, granüllü ya da macunumsu maddeler kolay alev alabilir olarak değerlendirilir. Metal tozları veya metal alaşımları tutuşturulduklarında ve alevin tüm örneğe 10 dakika veya daha kısa sürede sıçradığı durumlarda kolay alev alabilir olarak değerlendirilirler.

4. KAYNAKLAR

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



kalıp boyu: 250 mm
malzeme : Alüminyum

Şekil: Yığın hazırlamak için kalıp ve parçaları (Bütün boyutlar mm cinsinden)

A.11 ALEVLENİRLİK(GAZLAR)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntem hava ile karıştırılmış gazların oda sıcaklığında(yaklaşık 20 °C) ve atmosferik basınçta alev alıp almadığı ve eğer alevlenirse hangi konsantrasyonlarda gerçekleştiğini tayin eder. Hava ile test gazının artan konsantrasyonlarındaki karışımlar elektrik kıvılcımına maruz bırakılır ve ateşlenme olup olmayacağı gözlenir.

1.2. Tanım ve birimler

Alevlenebilir sınırı alt ve üst patlama sınırları arasındaki konsantrasyon aralığıdır. Alt ve üst patlama sınırları, hava ile karışım halinde bulunan alevlenebilen gazın, alev oluşturmadığı konsantrasyon sınırlarıdır.

1.3. Referans maddeler

Tanımlanmamış.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Havadaki gazın konsantrasyonu basamak basamak arttırılır ve karışım her bir basamakta bir elektrik kıvılcımına maruz bırakılır.

1.5. Kalite kriterleri

Belirlenmemiş

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Düzenek

Test kabı, iç çapı en az 50 mm ve yüksekliği en fazla 300 mm olan dikey bir cam silindirdir. Ateşleme elektrotları birbirlerinden 3 ile 5 mm uzaklıkla ayrılırlar ve silindirin alt kısmından 60 mm yukarı yerleştirilir. Silindir bir basınç uzaklaştırma açıklığı ile bağlanmıştır. Düzenek herhangi bir patlama hasarı olmayacak şekilde zırhla korunmak zorundadır.

Süresi 0,5 saniye olan devamlılık gösteren kıvılcım indüksiyonu, 10-15 kV luk çıkış voltajı ile bir yüksek voltaj dönüştürücüsünden (maksimum 300 W giriş gücü) üretilip, ateşleme kaynağı olarak kullanılır. Uygun bir düzenek örneği referans (2) de tanımlanmıştır.

1.6.2. Test koşulları

Testler oda sıcaklığında gerçekleştirilmelidir (yaklaşık 20 °C).

1.6.3. Testin performansı

Kademeli pompalar kullanılarak, hava içerisindeki derişimi bilinen gaz, silindirin içine aktarılır. Bir kıvılcım, karışımın içerisinden geçirilir ve alevin ateşleme kaynağından ayrılıp bağımsız olarak yayılıp yayılmadığı gözlemlenir. Gaz derişimi yukarıda anlatılan ateşleme sağlanana kadar hacim olarak %1'lik konsantrasyonu değişiklikleriyle denenir.

Eğer, gazın kimyasal yapısı onun yanıcı olmayan bir gaz olduğunu işaret eder ve stokiyometrik karışımın hava ile bileşimi hesaplanabilirse; sadece, stokiyometrik karışımın %10 fazlası ile stokiyometrik karışımın %10 azı arasında ki genişlikte %1 aralıklarla test yapmak yeterli olacaktır.

2. VERİ

Alev yayılımının oluşması bu özelliğinin belirlenmesinde kullanabilecek olan tek uygun bilgilendirici veridir.

3. RAPORLAMA

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- kullanılan maddenin kesin olarak teknik özellikleri (kimliği ve safsızlıklar),
- kullanılan düzeneğin boyut ölçüleri ile birlikte tam tanımı,
- testlerin gerçekleştirildiği sıcaklık,
- test edilen konsantrasyonlar ve elde edilen sonuçlar,
- testin sonucu: alevlenir olmayan gaz veya kolay alevlenir,
- eğer test edilen gaz, alevlenmeyen gaz olarak sonuç verirse o zaman %1'lik aralıklarla test edildiği konsantrasyon aralığı tanımlanmalı,
- sonuçların doğru yorumlanabilmesi için her türlü bilgi ve açıklamalar rapor edilmelidir.

4. KAYNAKLAR

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.
(2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse-Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. 'Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen`. Chem.-Ing.-Tech.1984, vol 56, 2, 126-127.

A.12. ALEVLENİRLİK (SU İLE TEMASLA)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu test yöntemi maddelerin, su veya nemli hava ile girdikleri reaksiyon sonucu oluşturdukları kolay alevlenir olabilecek tehlikeli miktarlarda gazın veya gazların belirlenmesinde kullanılır.

Test yöntemi katı ve sıvı maddeler için kullanılabilir. Bu yöntem hava ile temasında anında tutuşan maddeler için uygun değildir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Kolay alevlenir: Su veya nemli hava ile temaslarında minimum oran olan saatte 1 litre/kg gibi tehlikeli oranlarda kolay alevlenir gazlar yayan maddelerdir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Madde aşağıda tarif edilen birbirini izleyen basamaklara göre test edilir; herhangi bir basamakta tutuşma gerçekleşirse, testi devam ettirmeye gerek yoktur. Eğer maddenin suyla şiddetli tepkimeye girmediği biliniyorsa o zaman 4. basamağa geçilir (1.3.4).

1.3.1. Birincibasamak

Test maddesi, 20 °C deki damıtılmış su ile dolu kaba yerleştirilir ve yayılan gazın tutuşup tutuşmadığı not edilir.

1.3.2. İkincibasamak

Test maddesi 20 °C deki damıtılmış su ile dolu bir kabın üzerindeki yüzen süzgeç kâğıdının üzerine yerleştirilir ve yayılan gazın tutuşup tutuşmadığı not edilir. Süzgeç kâğıdı yalnızca maddeyi tek bir noktada tutup tutuşma şansını arttırmak için kullanılır.

1.3.3. Üçüncü basamak

Test maddesinden 2 cm yüksekliğinde ve 3 cm çapında bir istif yapılır. İstife birkaç damla su ilave edilir ve yayılan gazın tutuşup tutuşmadığı not edilir.

1.3.4. Dördüncü basamak

Test maddesi 20 °C deki damıtılmış su ile karıştırılır ve gaz yayılımı yedi saat boyunca her saat ölçülür. Yedi saatten sonra yayılım oranı düzensizse veya yükseliyorsa, ölçüm zamanı en fazla beş gün olmak üzere uzatılmalıdır. Test, yayılım oranı herhangi bir zaman saatte 1 litre/kg aşarsa durdurulabilir.

1.4. Referans maddeler

Tanımlanmamıştır.

1.5. Kalite kriterleri

Belirtilmemiştir.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Birinci basamak

1.6.1.1. Test koşulları

Testler oda sıcaklığında (yaklaşık 20 °C) gerçekleştirilmelidir.

1.6.1.2. Testin uygulanması

Test maddesinden küçük bir miktar (yaklaşık 2 mm çapında) 20 °C taki damıtılmış su ile dolu kaba yerleştirilir. Eğer gaz yayılımı olursa(i) veya tutuşma gerçekleşirse(ii) not edilmelidir. Eğer gazın tutuşması gerçekleştiyse, bu maddenin ileri testlerinin yapılmasına gerek yoktur çünkü madde tehlikeli kabul edilir.

1.6.2. İkincibasamak

1.6.2.1. Düzenek

Süzgeç kâğıdı düz bir biçimde herhangi bir uygun kap(örneğin 100 mm çapında buharlaşma kabı).içerisindeki damıtılmış su üzerinde yüzdürülür.

1.6.2.2. Test koşulları

Testler oda sıcaklığında (yaklaşık 20 °C) gerçekleştirilir.

1.6.2.3. Testlerin yürütülmesi

Test maddesinden küçük bir miktar (yaklaşık 2 mm çapında) süzgeç kağıdının ortasına yerleştirilir. Eğer gaz yayılımı olursa (i şeklinde) veya tutuşma gerçekleşirse (ii şeklinde) not edilmelidir. Eğer gaz tutuşması gerçekleştiyse, bu maddenin ileri testlerinin yapılmasına gerek yoktur çünkü madde, tehlikeli kabul edilir.

1.6.3. Üçüncü basamak

1.6.3.1. Test koşulları

Testler oda sıcaklığında (yaklaşık 20 °C) gerçekleştirilir.

1.6.3.2. Testin performansı

Test maddesinden tepesinde oyuk olan 2 cm yüksekliğinde ve 3 cm çapında bir yığın yapılır. Oyuğa birkaç damla su ilave edilir ve eğer gaz yayılımı olursa(i) veya tutuşma gerçekleşirse(ii) not edilmelidir. Eğer gaz tutuşması gerçekleştiyse, bu maddenin ileri testlerinin yapılmasına gerek yoktur çünkü madde tehlikeli kabul edilir.

1.6.4. Dördüncü basamak

1.6.4.1. Düzenek

Düzenek şekilde görüldüğü gibi kurulur.

1.6.4.2. Test koşulları

Test maddesinin kabını partikül büyüklüğü 500 µm'den küçük tozlar için gözden geçirin. Eğer madde toplamının toz içeriği madde miktarına göre %1 Ağırlık/Ağırlık (w/w) dan fazla ise veya örnek gevrek ve kırılgansa, test edilmeden önce bütün madde kullanım ve saklama için partikül büyüklüğü azaltılıp toz haline getirilir veya madde alındığı durumda test edilir. Testler oda sıcaklığında(yaklaşık 20 °C) gerçekleştirilmelidir.

1.6.4.3. Testin performansı

10 ml ile 20 ml su düzeneğin damlatma hunisine konur ve 10 g madde de erlene yerleştirilir. Yayılan gazın hacmi herhangi bir uygun araç tarafından ölçülebilir. Damlatma hunisinin tıpası suyun alttaki erlene damlaması için çıkartılır, bu sırada kronometre çalıştırılır. Gaz yayılımı yedi saat boyunca her saat ölçülür. Eğer bu zaman içerisinde gaz yayılım oranı düzensizse veya yükseliyorsa, ölçüm zamanı en fazla beş gün olmak üzere uzatılmalıdır. Test yayılım oranı herhangi bir zaman, saatte 1 litre/kg aşarsa teste devam edilmeyebilir. Bu test üç örnek ile yapılmalıdır.

Eğer maddeden yayılan gazın kimyasal türü bilinmiyorsa, gaz analiz edilmelidir. Eğer ortaya çıkan kolay alevlenir bileşenler içeriyorsa ve bütün gaz karışımının kolay alevlenir olup olmadığı bilinmiyorsa, aynı karışımdan bir örnek hazırlanıp test metodu A.11'e göre test edilmelidir.

2. VERİ

Madde,
- test işlem basamaklarının herhangi bir aşamasında kendiliğinden tutuşma meydana gelirse, veya
- saatte 1 litre/kg oranından daha fazla alevlenir gaz yayarsa,

tehlikeli kabul edilir.

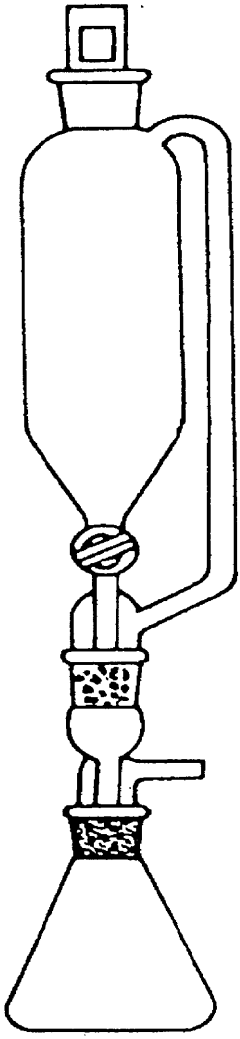
3. RAPORLAMA

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- kullanılan maddenin özellikleri (kimliği ve safsızlıklar),
- test maddesi için yapılan herhangi bir başlangıç hazırlığının detayları,
- testlerin sonuçları (1, 2, 3 ve 4ncü basamaklar),
- yayılan gazın kimyasal tanımı,
- eğer 4ncü basamak(1.6.4) testi gerçekleştiyse gaz yayılım hızı,
- sonuçların doğru yorumlanabilmesi için her türlü ek bilgi ve açıklamalar rapor edilmelidir.

4. KAYNAKLAR

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

Ek-I



Şekil: Düzenek

A.13. KATI VE SIVILARIN PİROFORİK ÖZELLİKLERİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntem, küçük miktarları oda sıcaklığındaki hava (yaklaşık 20 ^{0}C) ile temas etmesinden kısa bir süre içerisinde kendiliğinden tutuşan katı ve sıvılar için uygundur.

Bu yöntem, oda sıcaklığındaki havayla saatlerce veya günlerce maruz kalan veya artırılmış sıcaklıklarda tutuşması meydana gelen maddeleri kapsamaz.

1.2. Tanımlar ve birimler

Maddeler 1.6.'da belirtilen koşullar altında tutuşuyorlarsa veya kömürleşmeye neden oluyorsa piroforik özelliklere sahip oldukları kabul edilir.

Sıvıların kendiliğinden tutuşması ayrıca A.15. Kendinden Tutuşma Sıcaklığı Test Yöntemiyle (sıvılar ve gazlar) test edilmelidir.

1.3. Referans maddeler

Tanımlanmamıştır.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Katı veya sıvıtest maddesi reaksiyona girmeyen bir taşıyıcıya konup, beş dakika boyunca ortam sıcaklığındaki hava ile temas haline getirilir. Eğer sıvı madde tutuşmaz ise bir süzgeç kağıdı üzerine emdirilip beş dakika boyunca ortam sıcaklığındaki (yaklaşık 20 °C) havaya maruz bırakılır. Eğer sıvı veya katı madde tutuşursa veya süzgeç kâğıdı tarafından emilmiş sıvı tutuşur veya kömürleşmeye neden olursa, bu maddeler piroforik kabul edilir.

1.5. Kalite kriterleri

Tekrarlanabilirlik: güvenlik açısından, tek bir pozitif test sonucu bile maddenin piroforik kabul edilmesi için yeterlidir

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Düzenek

Yaklaşık 10 cm çapında porselen kap, oda sıcaklığındaki (ortalama 20 °C) silisli toprakla (diatomit) 5 mm yüksekliğinde doldurulur.

Not:

Bulunması kolay silisli toprak veya onunla mukayese edilebilecek herhangi bir reaksiyona girmeyen madde, bir kaza anında test edilen maddenin üzerine dökülebileceği zemini temsil ettiği farz edilmelidir. Kuru süzgeç kağıdı, reaksiyona girmeyen madde ile temas halinde hava ile temastan tutuşmayan sıvıları test etmek için gereklidir.

1.6.2. Testin performansı

a) Toz halindeki katılar

1 ila 2 cm^3 hacmindeki madde yanıcı olmayan bir yüzeye yaklaşık bir metre yükseklikten dökülür ve maddenin düşme esnasında veya yer yüzeyine çökmesinden sonra beş dakika içerisinde tutuşup tutuşmadığı gözlemlenir

Bu test tutuşma olmadıkça altı kez tekrarlanır.

b) Sıvılar

Yaklaşık 5 cm^3 hacmindeki test sıvısı, hazırlanmış olan porselen kaba dökülür ve beş dakika içerisinde tutuşma gerçekleşip gerçekleşmediği gözlemlenir.

Eğer altı testte tutuşma olmazsa, aşağıdaki test uygulanır:

0,5 ml test örneği çentikli bir filtre kâğıdına şırınga ile yerleştirilir ve sıvı yerleştirildikten sonraki beş dakika içerisinde filtre kâğıdında tutuşma veya kömürleşme oluşup oluşmadığı gözlemlenir. Bu test tutuşma ve kömürleşme görülmediği takdirde üç defa uygulanır.

2. VERİ

2.1. Sonuçların işlenmesi

Herhangi bir testte olumlu sonuç alındığı takdirde testlere devam edinilmeyebilir.

2.2. Yorum

Eğer madde reaksiyona girmeyen bir taşıyıcı içerisinde beş dakika boyunca havaya maruz kalması ile tutuşuyorsa veya bir sıvı hava ile olan beş dakikalık teması esnasında süzgeç kâğıdında tutuşmaya veya kömürleşmeye yol açıyorsa, bu madde piroforik kabul edilir.

3. RAPORLAMA

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- kullanılan maddenin tam özellikleri (kimliği ve safsızlıklar),
- testlerin sonuçları,
- sonuçların doğru yorumlanabilmesi için her türlü ek bilgi ve açıklamalar rapor edilmelidir.

4. KAYNAKLAR

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

A.14. PATLAYICI ÖZELLİKLER

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Yöntem bize sert veya hamurumsu maddelerin alev etkisi (termal duyarlılık) veya sürtünme (mekanik uyarım duyarlılığı) veya darbe altındaki patlama riski hakkında şematik test sonuçları sağlar ya da sıvı maddelerin alev ve darbe etkisindeki patlama risklerini gösterir. Yöntem üç bölümden oluşur:

(a) Termal duyarlılık testi (1);
(b) Darbe etkisine bağlı mekanik duyarlılık testi (1);
(c) Sürtünme etkisine bağlı mekanik duyarlılık testi (1);

Yöntem bazı belli yaygın uyarıcıların patlama başlatma ihtimallerinin tayin edilebilmesi için veri sağlar. Metodun amacı maddelerin herhangi bir şart altında patlamasını sağlamak değildir.

Yöntem maddelerin yönetmelikte belirtilmiş özel şartlar altında patlama tehlikesi (termal ve mekanik duyarlılık) gösterip göstermeyeceğini anlamak için uygundur. Yöntem belli sayıdaki uluslararası düzeyde genişçe kullanılan ve anlamlı sonuçlar veren düzenekler (1) üzerine kuruludur. Yöntemin kesin olmadığı kabul edilmiştir. Belirtilen düzeneğe alternatif olarak uluslararası kabul görmüş ve bu düzeneklerle yeterli derecede ilişkili sonuçlar veren düzenekler kullanılabilir.

Testler gerçekleştirilirken maddelerin bilinen termodinamik özelliklerine (örneğin oluşma ve bozunma ısısı) ve/veya yapısal formüllerinde belirli reaktif grupların (2) bulunmamasından dolayı bu maddelerin hızlı bozunma ile ortaya ısı ve gazlar çıkartmayacakları (yani bu maddelerin patlama riski taşımamaları) gibi mantıksal kuşkular oluşmamalıdır. Sıvılar için sürtünme bazlı mekanik duyarlılık testine ihtiyaç yoktur.

1.2. Tanımlar ve birimler

Patlayıcı:

Alev etkisi altında patlayabilen veya belirtilen düzenekler içinde darbeye veya sürtünmeye karşı hassas olan maddelerdir(ya da alternatif düzenekteki 1,3-dinitrobenzen'den daha fazla mekanik duyarlı olanlardır).

1.3. Referans maddeler

Sürtünme ve darbe yöntemleri için, 1,3 –dinitrobenzen0,5 mm elenmiş teknik kristalize ürün.

İkinci seri sürtünme ve darbe testleri için sulu siklohekzanondan yeniden kristallendirilmiş, 250 µm'lık sıvı 150 µm'lık normal elenmiş ve 103±2 derecede (4 saat boyunca) kurutulmuş perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, hekzojen, siklonit –CAS (Chemical Abstract Service) (Kimyasal Kuramlar Servisi) 121-82-4).

1.4. Test yönteminin ilkesi

Duyarlılığın üç testini uygularken güvenli koşulları sağlamak için ön-deneme testleri gereklidir.

1.4.1. Güvenli elleçleme testleri (3)

Güvenlik nedenlerinden dolayı, asıl testler yapılmadan önce, çok küçük miktarda örnekler (takriben 10 mg) gaz alevinde hapsedilmeden ısıya maruz bırakılmalı, darbe için herhangi bir uygun düzenek kullanılmalı ve sürtünme için örse değecek şekilde çekiç veya herhangi bir biçimdeki sürtünme makinesi kullanılmalıdır. Buradaki amaç, madde özellikle de termal duyarlılık konusunda, çok duyarlı ve patlayıcı ise onu tespit etmek ve duyarlılık testlerini önceden belirlemektir; Böylece esas testler özel dikkat altında gerçekleştirilir ve test teknisyeninin yaralanması engellenir.

1.4.2. Termal duyarlılık

Bu yöntem maddenin, iki tarafı farklı çaplarda delik plakalarla kapatılmış bir çelik tüp içerisinde ısıtılmasıdır. Böylece maddenin hangi yoğun ısı ve tanımlanmış hapsedilme ile patlayacağı tayin edilir.

1.4.3. Mekanik duyarlılık (darbe)

Bu yöntem belirlenmiş miktarda ağırlığın, belirlenmiş bir yükseklikten örnek maddeye atılmasını içermektedir.

1.4.4. Mekanik duyarlılık (sürtünme)

Bu yöntem sert ve hamurumsu maddelerin standard yüzeyler arasında belirlenmiş bağıl ve yüklü hareketlerle sürtünmeye maruz bırakılmalarını içermektedir.

1.5. Kalite kriterleri

Belirtilmemiş.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Termal duyarlılık (alevin etkisi)

1.6.1.1. Düzenek

Düzenek tekrar kullanılamaz çelik tüpün ve onun tekrar kullanılabilir kapatma cihazının (şekil 1) bir ısıtıcı ve koruyucu mekanizma içerisine yerleştirilmesinden oluşur. Her bir çelik tüp çelik levhadan derin çekilerek yapılır (bakınız Ek) ve 24 mm iç çap, 75 mm uzunluk ve 0,5 mm duvar kalınlığa sahiptir. Test tüplerin açık kenarlarına delikli plakaların yerleştirilmesine imkan vermek için kenarlar yapılmalıdır. Bu düzenek basınca dayanıklı ve merkezi delikli plakalar kullanır, bu plakalar iki parçalı cıvatalı bağlantı (somun ve yivli halka) ile tüpe sıkıca bağlanır. Somun ve yivli halka 800 dereceye kadar kıvılcım çıkartmayan krom-magnezyum

çeliğinden imal edilir (bakınız EK-I). Delikli plakalar geniş bir delik çapı yelpazesinde ve 6 mm kalığında ısıya dayanıklı çelikten yapılır.

1.6.1.2. Test koşulları

Normalde madde alındığı formunda test edilir ancak bazı durumlarda, örneğin madde preslenmiş, kalıplanmış ya da yoğunlaştırılmışsa öğütüldükten sonra test edilmelidir. Testte kullanılacak katı maddelerin materyal kütleleri iki aşamalı bir kurutma işlemi ile belirlenir. Boş, ağırlığı alınmış tüpe 9 cm^3 madde konur ve dik kesiti boyunca 80 N gücünde sıkıştırma uygulanır. Güvenlik nedenlerinden dolayı ve bazı durumlarda maddenin basınçtan dolayı fiziksel formunun değiştiği görüldüğü hallerde diğer doldurma işlemleri uygulanabilir; Örneğin madde sürtünmeye duyarlıysa sıkıştırma uygun olmayabilir. Materyal sıkıştırmaya uygunsa tüpe daha fazla örnek madde ekleyip tepeden 55 mm kalıncaya kadar sıkıştırılır. Tüpü tepeden 55 mm seviyesine kadar dolduracak toplam kütle belirlenir sonra iki adet daha 80 N gücünde sıkıştırılmış fazlalık/eklenti eklenir. Örnek madde tüpün tepesine 15 mm kalıncaya kadar ya sıkıştırılır yada çıkartılır. İkinci kurutma işlemi ilk kurutmada belirlenmiş sıkıştırılmış hacmin üçte biriyle başlar ve iki adet 80 N ile sıkıştırılmış eklenti konur. Bütün materyal tüpün tepesine 15 mm kalacak şekilde eklenir veya çıkartılır. Bütün test denemeleri için ikinci kurutma işleminde belirlenen miktar kullanılır; doldurma üç eşit miktarda madde ile yapılır, her miktar 9 cm^3 gelinceye kadar sıkıştırılır bunu yapmak için ne kadar güç gerekiyorsa uygulanır (Bu işlem özel halkalar kullanılarak kolaylaştırılabilir).

Sıvılar ve jeller, tüplere 60 mm yüksekliğe kadar doldurulur, bu esnada özellikle jellerin içinde boşluk kalmamasına dikkat edilir. Yivli halka alttan tüpe takılır, uygun delikli plaka eklenir ve molibden disülfür bazlı yağ ile yağlanmış somun takılır. Burada dikkat edilmesi gereken yivin, plakanın ve flanşın arasında tayini yapılan maddeden bulunmadığını kontrol etmektir.

Isı, bir metre mesafedeki endüstriyel propan tüplerinin basınç regülatörüne (60 ile 70 mbar) bağlı bir manifold sayesinde eşit dağıtılmış (alev bekinden çıkan alevin görsel incelenmesi ile belirlendiği gibi) dört bek ile sağlanır. Alev bekleri test odasının etrafına şekil 1 deki gibi konumlandırılır. Dört bekin ortak propan tüketimi dakikada 3,2 litredir. Alternatif yakıt gazları ve bekler kullanılabilir ama ısıtma oranları şekil 3'ün belirttiği oranlarda olmalıdır.
Bütün ısıtma düzeneklerinin ısıtma oranları periyodik olarak dibutil ftalat dolu tüpler kullanılarak şekil 3 deki oranlarla uygunluğu kontrol edilir.

1.6.1.3. Testin performansı

Her bir test tüpünün parçalanmasına veya beş dakika boyunca ısıtılmasına kadar devam eder. Tüpün iki, üç veya daha fazla parçaya ayrılması ya da şekil 2 de tanımlandığı gibi bazı durumlarda ince metal şeritlerle birbirlerine hala bağlı kalan parçaların oluştuğu testler patlamaya neden olmuş kabul edilir. Çok az veya hiç parçalanma meydana gelmeyen testlerde patlama meydana gelmemiş kabul edilir.

İlk olarak 6,0 mm çaplı delikli plakalarla üç testlik bir seri yapılır ve eğer patlama meydana gelmediyse 2,0 mm çaplı delikli plakalarla ikinci bir üç testlik seri yapılır. Bu iki test serisi esnasında patlama meydana geldiyse başka testler yapmaya ihtiyaç yoktur.

1.6.1.4. Değerlendirme

Yukarıdaki testler esnasında patlama meydana gelirse test sonucu pozitif kabul edilir.

1.6.2. Mekanik duyarlılık (darbe)

1.6.2.1. Düzenek (şekil 4)

Tipik bir düşen çekiç düzeneğinin temel bileşenleri, sağlam tabanı olan ve çelikten dökülmüş bir blok, örs, kolon, yönlendirici parçalar, düşüş yüksekliği göstergesi, serbest bırakma mekanizması ve bir örnek tutucudur. 450 mm (uzunluk)×450 mm (genişlik) ×60 mm (yükseklik) ölçülerinde dökme tabana sahip 230 mm (uzunluk) ×250 mm (genişlik) ×200 mm (yükseklik) 'teki çelik bloğun üstüne, 100 mm (çap) ×70 mm (yükseklik) ölçülerindeki çelik örs vidalanır. Kaynaksız çekme çelikten yapılma tüp, çelik bloğun arkasına vidalanmış bir tutucu ile sağlama alınır. Düzenek dört vida ile 60 ×60 ×60 cm boyutlarındaki beton bloğa tutturulur, ama düzenekteki yönlendirici rayların kesinlikle dikey olması ve bırakma ağırlıklarının serbestçe düşmesi gerekmektedir. Sert çelikten yapılan 5 ve 10 kilogramlık ağırlıklar kullanılır. İki ağırlığın çarpma başları sertleştirilmiş çelikten yapılır, HRC 60'tan 63'e kadar ve minimum çapları 25 mm'dir.

Test yapılacak örnek, biri diğerinin üzerinde duran iki eş desenli sert çelik silindirden oluşan darbe mekanizmasının arasına konur, bu silindirik mekanizma içi boş silindirik çelik yönlendirici halkanın içine konur. Sert çelik silindirlerin HRC sertlikleri 58'ten 65'e kadar, 10 (-0,003, -0,005) mm çapları, 10 mm yükseklikleri, cilalanmış yüzeyleri ve yuvarlatılmış köşeleri (kavis yarıçapı 0,5 mm) vardır. Yönlendirici borunun dış çapı 16 mm, namlusunun cilalı ve çapı 10 (+ 0,005 +0,010) mm ve yüksekliği 13 mm olmalıdır. Darbe mekanizması çelikten yapılmış (çapı 26 mm ve yüksekliği 26 mm) bir ara örsün ortasına dumanın kaçmasına izin veren delikleri olan bir halka ile monte edilir.

1.6.2.2. Test koşulları

Örneğin hacmi, 40 mm^3 yada alternatif düzeneklerde düzeneğin kapasitesine uyacak kadar olmalıdır. Katı cisimler kuru halde test edilmelidir. Bu maddeleri hazırlamak için:

(a) Öğütülmüş malzeme elenir (elek genişliği 0,5 mm) ve elekten geçen malzeme test için kullanılır:
(b) Preslenmiş, kalıplanmış ve yoğunlaştırılmış malzeme küçük parçalara ayrılır ve elenir. Elekten geçen 0,5 ila 1 mm çaplı malzeme test için kullanılır, bu elenmiş malzemelerin ana maddeyi birebir temsil etmesi gerekir.

Macun kıvamındaki malzemeler, mümkünse katı yapıda test edilmelidir ya da bazı özel durumlarda olduğu gibi içindeki sıvılar mümkün olan maksimum düzeyde uzaklaştırılmalıdır. Sıvı maddelerin testi yapılırken, iki çelik silindir arasında 1 mm boşluk bırakılmalıdır.

1.6.2.3. Test performansı

İlk seride altı test yapılır ve burada 10 kg kütle 0,40 m (40 J)'den bırakılır. Patlama sağlanırsa 5 kg'lik kütlenin 0,15 m (7,5 J) yükseklikten bırakıldığı sonraki 6'lı test serisine geçilmelidir. Diğer düzenekte örnekler, önceden belirlenmiş ve başarı sağlamış bir işlem (örneğin yukarı ve aşağı tekniği vs.) ile kıyaslanır.

1.6.2.4. Değerlendirme

Belirlenmiş darbe testi düzenekleri kullanılarak yapılan testler sırasında herhangi bir patlama (test malzemesi alevler içinde kalırsa ve/veya patlamaya benzer bir durum rapor edilirse) meydana gelmişse veya örnek alternatif test düzeneklerinde referans madde, 1,3-dinitrobenzen ve RDX'ten daha duyarlı çıktıysa test sonucu pozitiftir.

1.6.3. Mekanik duyarlılık (Sürtünme)

1.6.3.1. Düzenek (şekil 5)

Sürtünme düzeneği dökme çelik taban üzerine yerleştirilmiş sürtünme cihazından oluşur. Bu cihaz sabit porselen pim ve hareketli porselen levha içermektedir. Porselen levha iki yönlendirici sayesinde hareket eden bir kızakta durur. Kızak bir elektrik motoruna, bir gergi çubuğuna, bir eksantrik kama ve porselen plakayı sadece bir kere öne ve arkaya doğru 10 mm götürecek vites kutusuna bağlıdır. Porselen pime, 120 ile 360 Newton arası güç yüklenebilir.

Porselen plakalar, beyaz teknik porselenden (9 ila 32 μm arası pürüzlülükte) 25 mm (uzunluk) ×25 mm (genişlik) ×5 mm (yükseklik) ebatlarında yapılır. Silindirik porselen pim de teknik beyaz porselenden 10 mm uzunluk ve 10 mm çapla yapılmıştır ve 10 mm kavis yarıçaplı sertleştirilmiş küre şeklinde ucu vardır.

1.6.3.2. Test koşulları

Testte kullanılacak örnek 10 mm^3 hacmindedir, diğer alternatif düzenekler kendi uygun hacimlerini kullanır.

Katı maddeler kuru halde test edilir ve aşağıdaki gibi hazırlanır:

(a) Öğütülmüş malzeme elenir (elek genişliği 0,5 mm) ve elekten geçen malzeme test için kullanılır:

(b) Preslenmiş, kalıplanmış ve yoğunlaştırılmış materyaller ufak parçalara ayrılır ve elenir. Elekten geçen 0,5 mm'den küçük çaplı malzemeler test için kullanılır.

Macun kıvamındaki malzemeler mümkünse kuru halde test edilmelidir. Madde kuru yapıda hazırlanamıyorsa, macun (içindeki sıvılar mümkün olan maksimum düzeyde uzaklaştırılmış olarak) bir kalıp sayesinde 0,5 mm kalınlığında, 2 mm genişlikte ve 10 mm uzunlukta bir film oluşturulur ve bu sayede test edilir.

1.6.3.3. Test performansı

Porselen pim, örneğin üzerine test için getirilir ve yük uygulanır. Test yapılırken porselen plakadaki süngerimsi izler hareket yönüne tam ters doğrultuda kalmalıdır. Pimin maddenin üstüne yaslanması, yeterli miktarda test malzemesinin pimin tam altında olması ve porselen plakanın pimin altında doğru hareket etmesi çok önemlidir. Macunumsu malzemeler için 0,5 mm kalınlığında 2×10 mm'lik oyuk maddenin plakaya uygulanmasında kullanılır. Porselen plaka pimin altında öne ve arkaya doğru olan 10 mm'yi 0,44 saniyede kat etmesi gerekir. Plakanın bütün yüzeyleri ve pim sadece bir kere kullanılabilir; pim iki ucu ile iki deneme, porselen plakanın her bir tarafı üç deneme olmak üzere iki yüzeyide kullanabilir.

Önce altı testlik bir seri 360 N'luk yükleme ile yapılır. Bu altı test esnasında olumlu bir durum yakalanırsa 120 N'luk yükleme ile altı testlik bir seri yapılmalıdır. Diğer düzeneklerde örnekler önceden belirlenmiş referans malzemeleri ile karşılaştırılır; bu da önceden kabul edilmiş işlem (örneğin yukarı ve aşağı tekniği vs.) ile yapılır.

1.6.3.4. Değerlendirme

Bu test için belirlenmiş sürtünme düzeneğiyle yapılan testlerin herhangi birinde en az bir kere patlama (test malzemesi alevler içinde kalırsa ve/veya patlamaya benzer bir durum olursa) meydana gelirse veya alternatif sürtünme test düzeneklerindeki denk ölçüt yerine getirilirse testlerin sonucu pozitif kabul edilir.

2. VERİ

İlke olarak bir madde, termal, darbe yada sürtünme duyarlılık testlerinde pozitif sonuç verirse, yönetmeliğe göre bu maddenin patlama tehlikesi riski gösterdiği kabul edilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Bir test raporu aşağıdaki bilgileri içerir:
- test edilen maddenin kimliği, bileşimi, saflığı, nem oranı vs.,
- maddenin fiziksel durumu ve ezilmiş, kırılmış ve/veya elenmiş durumda olup olmadığı,
- termal duyarlılık testi esnasındaki gözlemler (örneğin malzemenin kütlesi ve parçalanma ürünü sayısı),
- mekanik duyarlılık testleri esnasındaki gözlemler (örneğin; dikkate alınacak derecede duman oluşumu veya malzemenin patlama sesi, kıvılcım, alevler, çatırdamalar vb. olmadan tamamen bozunması),
- her türlü testin sonuçları,
- alternatif düzenekler kullanıldıysa, alternatif düzeneklerden alınan sonuçlarla belirtilen düzeneklerin verdiği sonuçlar arasındaki bağlantının bilimsel ispatı gereklidir.
- benzer ürünlerle yapılan testlerde edilen bilgiler ve bu bilgilerin yapılan testlerin sonuçlarının doğru yorumlanması için kullanılması,
- sonuçların doğru yorumlanması için ilgili olan bütün ek açıklamalar.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Test raporu, yanlış, anormal olduğu ya da örnek oluşturmadığı düşünülen her türlü sonuçtan bahsetmelidir. Eğer bir sonuç sayılmayacaksa, bunun için bir açıklama oluşturulmalı ve alternatif ve destekleyici testler belirtilmelidir. Anormal bir sonuca açıklama getirilemediği durumlarda, sonuç olduğu gibi kabul edilmeli ve sınıflandırmada kullanılmalıdır.

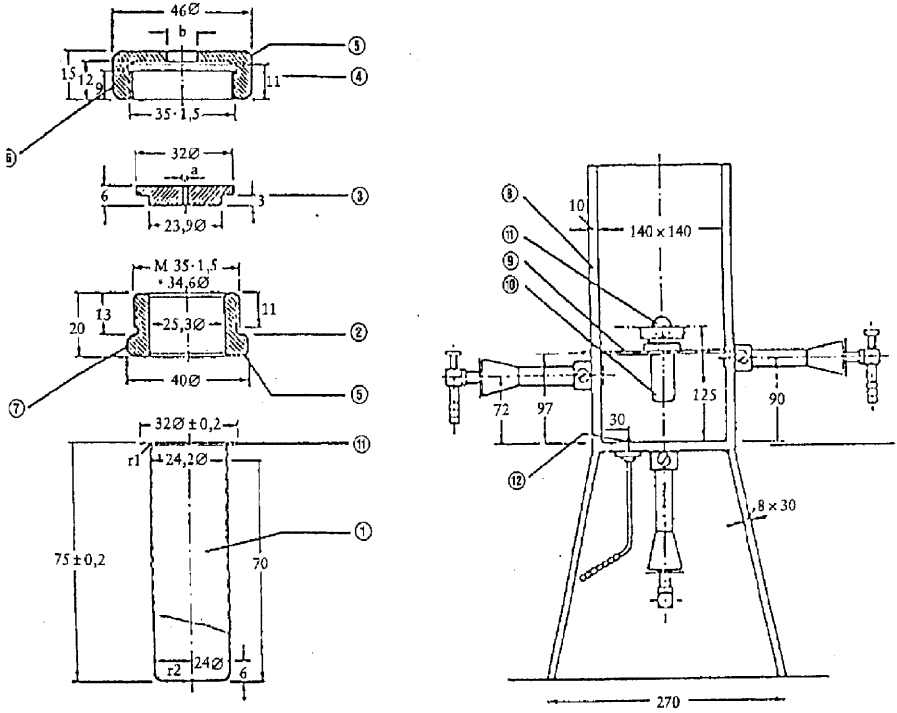
4. KAYNAKLAR

(1) Recommendations on the Transport of Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
(2) Bretherick, L., handbook of Reactive Chemicals 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 (Sept. 85). Chemicalproducts for industrial use- Determination of explosion risk.

Ek-I

Termal duyarlılık testi için malzeme teknik özelliği örneği(bakınız DIN1623)

(1) Tüp: Malzeme teknik özelliği No 1.0336.505 g
(2) Delikli plaka: Malzeme teknik özelliği No 1.4873
(3) Yivli halka ve somun: Malzeme teknik özelliği No 1.3817



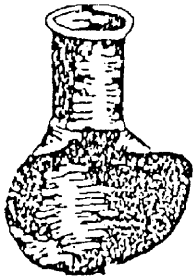
Şekil 1: Termal duyarlılık test düzeneği (bütün boyutlar milimetre cinsinden)

Şekil 1a Çelik tüp ve donanımları

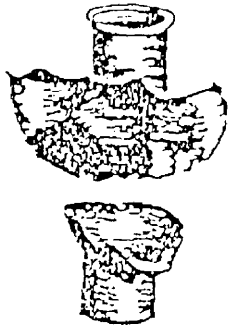
(1) Tüp
(1a) Dış flanş
(2) Yivli halka; düşük sürtünmeli yiv
(3) Delikli plaka a = 2,0 ya d 6,0 mm çapında
(4) Somun b = 10 mm çapında
(5) Yivli yüzey
(6) 41'lik 2 taraflı yivli kapak

Şekil 1b Isıtma ve korunma aleti

(7) 36'lık 2 taraflı yivli kapak
(8) Çatlamaz kutu
(9) 2 adet tüp destekleyici çubuk
(10) Sabitlenmiş tüp
(11) Arka yakıcı mevkisi; diğer yakıcılar görünmektedir
(12) Kılavuz püskürtücü



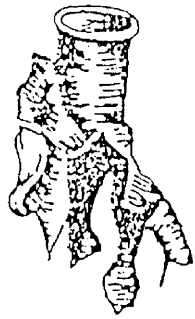
Patlama gerçekleşmemiş



Patlama gerçekleşmemiş



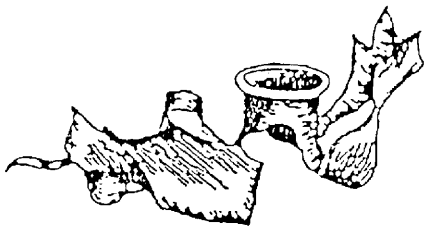
Patlama gerçekleşmiş



Patlama gerçekleşmiş

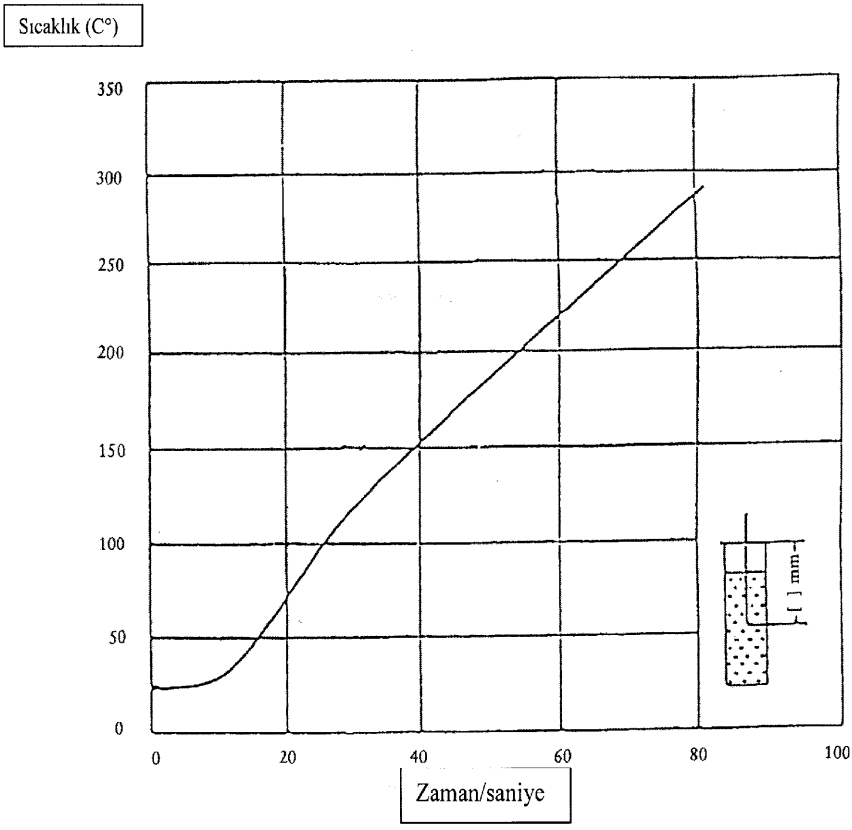


Patlama gerçekleşmiş



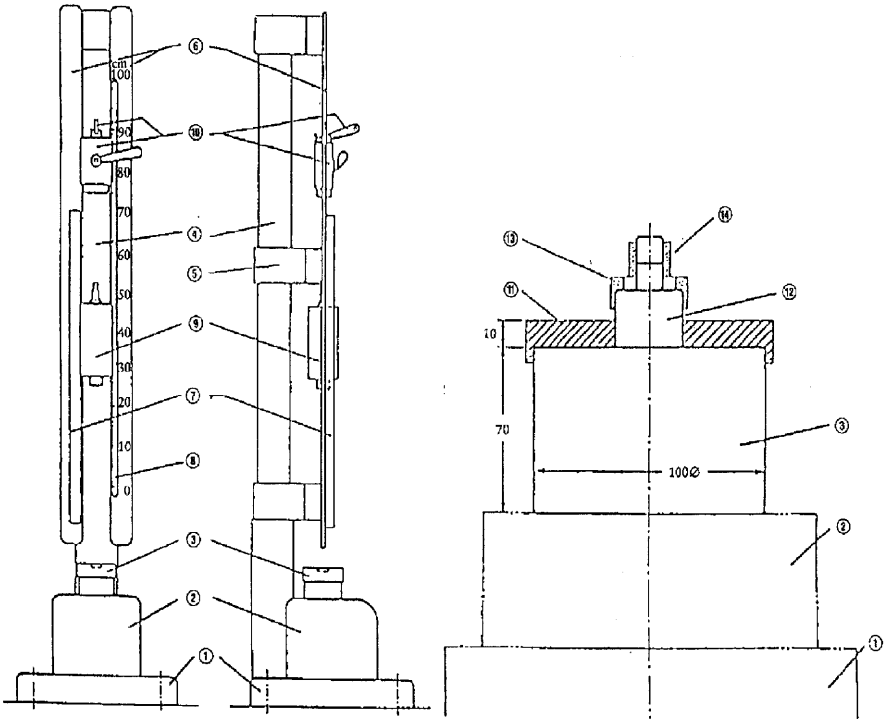
Patlama gerçekleşmiş

Şekil 2: Termal duyarlılık testi (parçalanma örnekleri)



Şekil 3: Termal duyarlılık testi için ısınma hızı kalibrasyonu

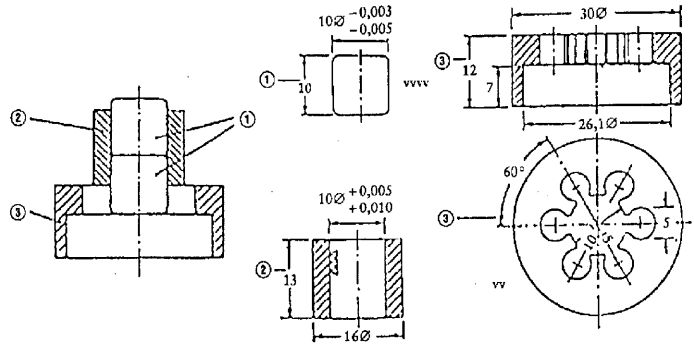
Sıcaklık/zaman eğrisi dibutil ftalat'ın (27 cm^3) kapalı (1,5 mm delikli plaka) bir tüp içerisinde 3,2 litre/dakika akışı olan propanla ısıtılması ile elde edilir. Sıcaklık tüpün kenarından 43 mm içeriye merkeze yerleştirilmiş ve kromel/alumel ısıl çitin içine yerleştirildiği 1mm çapında paslanmaz çelik termometre ile ölçülür. Isınma hızı 135 derece ile 285 derece arasında 185 ila 215 K/dakika olmalıdır.



Şekil 4 Darbe testi düzeneği (bütün boyutlar milimetre cinsinden)

Şekil 4aDüşen_çekiç, önden ve yandan, genel Şekil 4b Düşen_çekiç, alt taraf görünüm

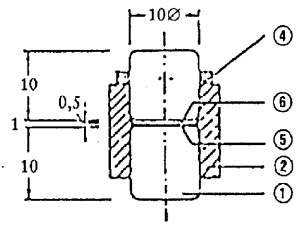
(1) Taban, 450×450×60
(2) Çelik blok, 230×250×200
(3) Örs, 100 çap ×70
(4) Kolon
(5) Ara çapraz-eleman
(6) 2 yürütücü
(7) Dişli çubuk
(8) Dereceli cetvel
(9) Düşen_çekiç (Düşme ağırlığı)
(10) Serbest bırakma mekanizması
(11) Yerleştirme plakası
(12) Ara örs (değiştirilebilir), 26 çap×26
(13) Delikli silindirik yerleştirme halkası
(14) Darbe mekanizması



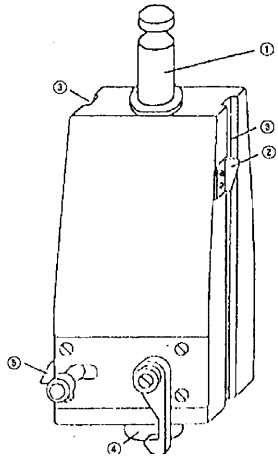
Şekil 4(Devam)

Şekil 4c: Macunumsu veya toz halindeki malzemeler için darbe mekanizması

(1) Çelik silindirler
(2) Çelik silindirler için yürütücü halka
(3) Silindirik yerleştirme halkası
    (a) Dikey kesit
    (b) Plan
(4) Kauçuk halka
(5) Sıvı malzeme (40 mm^3)
(6) Sıvı bulunmayan boşluk

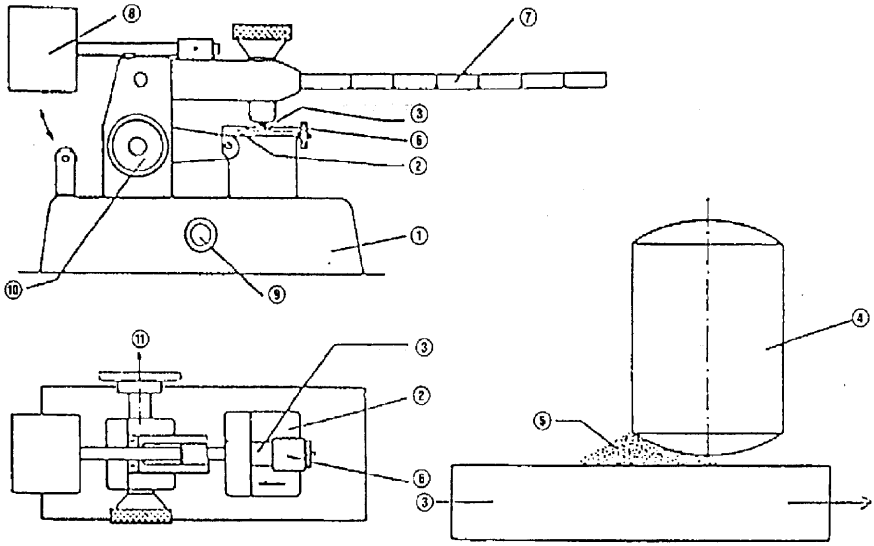


Şekil 4d: Sıvı malzemeler için darbe mekanizması



Şekil 4e: Çekiç (Düşme ağırlığı 5 kg)

(1) Süspansiyon tapası
(2) Yükseklik işareti
(3) Hizalama oluğu
(4) Silindirik çarpışma başı
(5) Geri tepme engelleyici



Şekil 5: Sürtünme duyarlılık düzeneği

Şekil 5a: Sürtünme mekanizması; Tepeden ve plan görünüşü

(1) Çelik taban
(2) Hareketi kızak
(3) Porselen plaka, 25x25x5 mm, taşıyıcıda duran
(4) Sabit porselen pim, 10 çap x 15 mm
(5) Test edilen örnek, yaklaşık 10 mm^3

Şekil 5b: Pimin örnek üzerinde başlangıç pozisyonu

(6) Pim tutucu
(7) Yüklenme kolu
(8) Karşı ağırlık
(9) Anahtar
(10) Başlangıç konumunda kızağı ayarlayan teker
(11) Elektrik hareket motorunun yönü

A.15. KENDİLİĞİNDEN TUTUŞMA SICAKLIĞI (SIVILAR VE GAZLAR)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Patlayıcı maddeler ve ortam sıcaklığındaki hava ile temaslarında kendiliğinden tutuşan maddeler, bu teste tabi tutulmamalıdır. Bu test işlemi, ortamda hava bulunduğunda sıcak yüzeyler tarafından tutuşabilen gazlar, sıvılar ve buharlar içindir.

Kendiliğinden tutuşma sıcaklığı, yüzey malzemesi, daha büyük hacimli test kabı ve katalitik safsızlıkların varlığı ile oldukça düşürülebilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Kendiliğinden tutuşmanın derecesi, kendiliğinden tutuşma sıcaklığı ifadesi ile belirtilir. Kendiliğinden tutuşma sıcaklığı test yönteminda belirtilen şartlar altında hava ile karışmış test maddesinin tutuştuğu en düşük sıcaklıktır.

1.3. Referans maddeler

Referans maddeler standardlarda belirtilmiştir (bakınız 1.6.3.). Referans maddelerin ana amacı test yöntemin yapılabilirliliğini zaman zaman kontrol etmektir ve ayrıca diğer yöntemlerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırma yapılabilmesini sağlamaktır.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Yöntem, hapsedilmiş gazın, buharın veya içeriye enjekte edilen sıvının tutuşmasını sağlayan duvarın yüzeyindeki en düşük sıcaklığı tespit eder.

1.5. Kalite kriterleri

Tekrarlanabilirlik, kendinden tutuşma sıcaklıklarının dağılımına ve kullanılan test yöntemina bağlı olarak değişir.

Duyarlılık ve seçimlilik, kullanılan test yöntemina bağlı olarak değişir.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Düzenek

Düzenek1.6.3.'de belirtildiği yöntemde tarif edilmiştir.

1.6.2. Test koşulları

Test maddesinden bir örnek 1.6.3.'te belirtilen yöntemde tanımlanmıştır.

1.6.3. Testin performansı

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

2. VERİ

Tutuşma gerçekleşene kadar, test sıcaklığı, atmosferik basınç, kullanılan örneğin miktarı ve geçen zaman farkı kaydedilir.

3. RAPORLAMA

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan maddenin tam olarak teknik özellikleri (kimliği ve safsızlıklar),
- kullanılan örneğin miktarı, atmosferik basınç,
- kullanılan düzenekler,
- yapılan ölçümlerin sonuçları (test sıcaklığı, tutuşmayı ilgilendiren sonuçlar, denk gelen zaman farkı)
- sonuçların doğru yorumlanabilmesi için her türlü ek bilgi ve açıklamalar rapor edilmelidir.

4. KAYNAKLAR

Kaynak yok.

A.16. KATILAR İÇİN GÖRECELİ KENDİLİĞİNDEN TUTUŞMA SICAKLIĞI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Patlayıcı maddeler ve ortam sıcaklığındaki hava ile temaslarında kendiliğinden tutuşan maddeler bu teste tabi tutulmamalıdır.

Bu testin amacı, yükseltilmiş sıcaklıklarda katı maddelerin kendiliğinden yanabilirliği hakkında ilk bilgileri sağlamaktır.

Maddenin hava ile olan tepkimesinden veya ekzotermik bozulma ile meydana gelen ısı yeterli seviyede çevresine dağılmıyorsa, kendiliğinden ısınma, kendiliğinden tutuşmaya yol açabilir. Bu yüzden kendiliğinden tutuşma, üretilen ısı miktarının kaybedilen ısı miktarını aştığı durumlarda meydana gelir.

Test işlemi, katı maddeler için ön tarama testi olarak kullanışlıdır. Katı maddelerin kendiliğinden alev alması ve tutuşmasının karmaşık doğasından dolayı bu test sadece karşılaştırma amacıyla kullanılmalıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Bu yöntemle elde edilen kendiliğinden tutuşma sıcaklığı, belirli şartlar altında belli miktarda maddenin tutuşmasının minimum ortam sıcaklığında °C cinsinden belirtilir.

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test altındaki maddenin belirli bir miktarı, oda sıcaklığındaki fırına yerleştirilir; fırının sıcaklığı 0,5°C/dak oranında 400°C'ye kadar veya erime sıcaklığı düşükse erime derecesine kadar artırılırken, örnek maddenin ortasındaki şartlar ile ilgili sıcaklık/zaman eğrisi kaydedilir. Bu testin amacı için örnek madde sıcaklığının kendiliğinden ısınma ile 400 °C'ye ulaştığındaki fırın sıcaklığı, kendiliğinden tutuşma sıcaklığı olarak adlandırılır.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Düzenek

1.6.1.1. Fırın

Isı programlı bir laboratuvar fırını (yaklaşık 2 litre hacimli) doğal hava dolaşımı ve patlama sahası ortasına yerleştirilmiştir. Potansiyel patlama riskini önlemek için, bozunma ile oluşan gazların, elektrikli ısı kaynaklarıyla olabilecek teması kesinlikle engellenmelidir.

1.6.1.2. Tel örgü küpü

0,045 mm açıklıkları olan paslanmaz çelik tel örgünün bir parçası, şekil 1'de belirtilen örneğe göre kesilmelidir. Örgü katlanmalı ve tel ile sağlamlaştırılıp tepe kısmı açık bir küp haline getirilmelidir.

1.6.1.3. Isıl çiftler

Uygun ısıl çiftler

1.6.1.4. Kaydedici

0 °C'den 600 °C'ye kadar veya buna karşılık gelen voltaja kalibre edilmiş herhangi bir iki kanallı kaydedici.

1.6.2. Test koşulları

Maddeler alındıkları halde test edilir.

1.6.3. Testin performansı

Küp, test yapılacak madde ile doldurulur ve hafifçe sıkıştırılır, küp tamamen dolana kadar örnek madde ilave edilir. Örnek madde ile doldurulmuş küp oda sıcaklığında bulunan fırının ortasına asılır. Isıl çiftten bir tanesi fırının ortasına yerleştirilirken diğeri fırının sıcaklığını ölçmek için küp ile fırın duvarının arasına yerleştirilir.

Fırının sıcaklığı 0,5°C/dak oranında 400°C'ye kadar veya erime sıcaklığı düşükse erime sıcaklığına kadar artırılırken örnek maddenin ve fırının sıcaklığı devamlı olarak ölçülür.

Madde tutuştuğu zaman, örneği ölçen ısıl çift, fırın sıcaklığının üzerinde oldukça keskin bir sıcaklık artışı gösterir.

2. VERİ

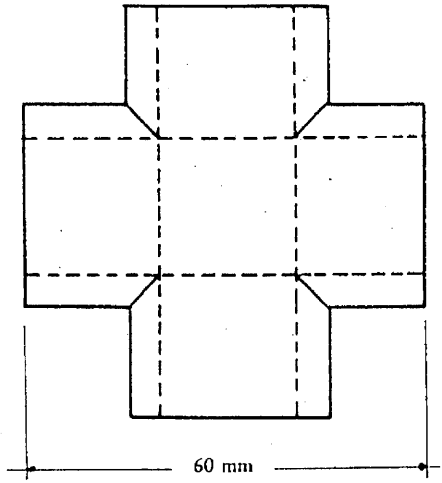
Örneğin sıcaklığı kendiliğinden ısınma ile 400°C dereceye ulaştığındaki fırın sıcaklığı, değerlendirme için dikkate alınır. (bknz. şekil 2)

3. RAPORLAMA

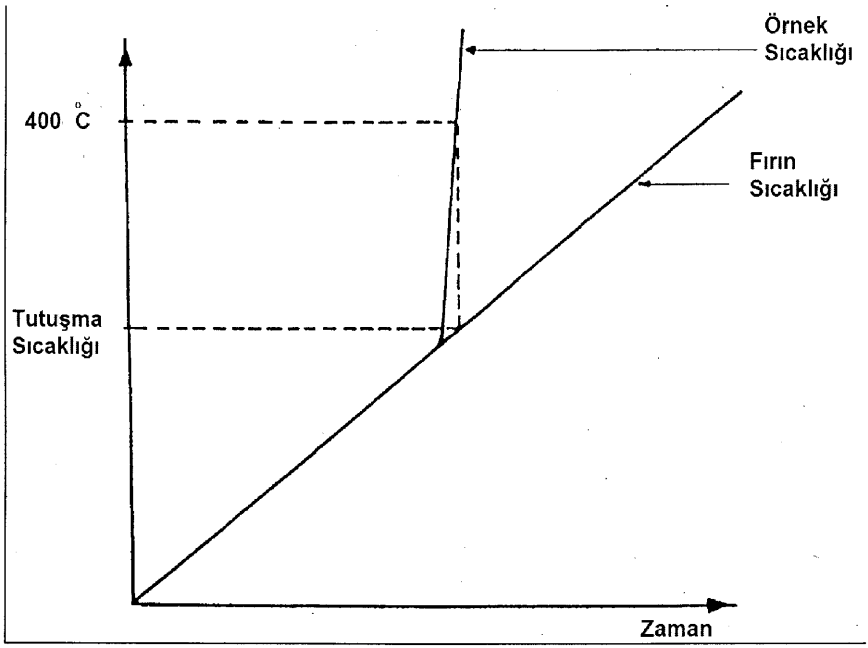
Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- test için kullanılacak maddenin tanımı,
- sıcaklık/zaman eğrisi dahil olmak üzere ölçümlerin sonuçları,
- sonuçların uygun olarak yorumlanabilmesi için her türlü ilave açıklamalar.

4. KAYNAKLAR

(1) NF T 20-0336 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.



Şekil 1
20 mm test küpünün modeli



Şekil 2
Tipik sıcaklık/zaman eğrisi

A.17. OKSİTLEYİCİ ÖZELLİKLER (KATILAR)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Testleri uygulamadan önce maddenin herhangi bir potansiyel patlayıcı özelliği olup olmadığı hakkında ön bilgiye sahip olmak yararlıdır.

Bu test, sıvılar, gazlar, patlayıcı ve kolay alevlenir maddeler ile organik peroksitlere uygulanamaz.

Maddenin yapısal formülü incelendikten sonra bu maddenin yanabilir madde ile ekzotermik olarak tepkimeye girmeyeceği gerçekçi kuşkuların ötesindeyse bu testin uygulanması gerekmez.

Testlerin özel önlemlerle yapılıp yapılmayacağını tespit etmek için, ön testler yapılmalıdır.

1.2. Tanım ve birimler

Yanma zamanı: 1.6'da anlatılan işlem takip edilerek, tepkime alanından bir hat boyunca alınan saniye cinsinden reaksiyon zamandır.

Yanma sürati: milimetre/saniye olarak ifade edilir.

Azami yanma sürati: Ağırlıkça % 10-90 arasında oksitleyici ihtiva eden karışımlardan elde edilmiş yanma süratlerinin en hızlısıdır.

1.3. Referans maddeler

Baryum nitrat (analitik saflıkta), hem testler hem de ön testler için referans madde olarak kullanılır.

Referans karışım, baryum nitrat ile toz haldeki selülozdan 1.6'da tarif edildiği gibi hazırlanmış ve azami yanma hızına sahip olan karışımdır (genellikle ağırlıkça % 60 baryum nitrat ihtiva eden karışımdır).

1.4. Test yönteminin ilkesi

Güvenlik açısından ön test yapılır. Test maddesi ön testler esnasında açıkça oksitleyici özelik gösterirse ilave test yapılmasına gerek yoktur. Eğer durum bunu göstermiyorsa, maddeye tam test uygulanmalıdır.

Tam testte, test edilecek madde ve belirlenmiş bir yanıcı madde belirli oranlarda karıştırılır. Her karışım bir hat haline getirilir ve bu hat bir ucundan tutuşturulur. Belirlenen azami yanma hızı, referans karışımdan elde edilen azami yanma hızı ile karşılaştırılır.

1.5. Kalite kriterleri

Gerekli görüldüğü takdirde, yapılacak 6 ayrı azami yanma hızı testinin sonuçlarının aritmetik ortalamadan %10 sapma göstermediği sürece her türlü öğütme ve karıştırma yöntemi geçerlidir.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Hazırlık

1.6.1.1. Test maddesi

Test örneğinin partikül büyüklüğü, aşağıdaki işlem kullanılarak < 0,125 mm'ye indirgenir: Test maddesi elenir, elekte kalan parçalar öğütülür, bu işleme test maddesinin bütünü elekten geçirilene kadar devam edilir.

Kalite kriterine uyulduğu sürece her türlü eleme ve öğütme yöntemi kullanılabilir.

Karışım hazırlanmadan önce test maddesi sabit ağırlığına kavuşması için 105 °C'de kurutulur. Test edilecek maddenin bozulma sıcaklığı 105 °C'den daha düşükse madde uygun olan daha düşük bir sıcaklıkta kurutulmalıdır.

1.6.1.2. Yanıcı madde

Toz haldeki selüloz yanıcı madde olarak kullanılır. Burada kullanılan selüloz, ince tabaka kromatografisi ve kolon kromatografisinde kullanılan türden olmalıdır. Ayrıca %85'inden fazlasının lif uzunlukları, 0,020 mm ile 0,075 mm arasında olan selüloz türünün uygun olduğu kanıtlanmıştır. Toz haldeki selüloz, gözenek büyüklüğü 0,125 mm olan elekten geçirilir. Test boyunca aynı kısımdan alınan selüloz kullanılır.

Karışım hazırlanmadan önce toz haldeki selüloz 105 °C'de sabit ağırlık elde edilene kadar kurutulur.

Eğer ön testlerde odun tozu kullanılacaksa, yumuşak bir tahtanın 1.6 mm'lik elekten geçirilen odun tozunu toplanır, iyice karıştırılır, daha sonra kalınlığı 25 mm'den fazla olmamak kaydıyla tabaka halinde 105 °C'de 4 saat kurutulur. Odun tozunu soğutulur ve gerekli olan zamana kadar, tercihen kurutulmasından sonraki 24 saat içinde, hava geçirmeyen kap içerisine mümkün olduğu kadar doldurarak saklanır.

1.6.1.3. Tutuşturma kaynağı

Gaz yakıcısından (çapı asgari 5 mm olan) gelen sıcak alev ateşleme kaynağı olarak kullanılmalıdır. Eğer başka bir ateşleme kaynağı kullanıldıysa (örneğin; inert atmosferde test yapılırken) , tutuşturma kaynağının tarifi ve kullanılması için gerekçe raporlanmalıdır.

1.6.2. Testin performansı

Not:

Oksitleyicilerin, selüloz veya ince odun tozu ile olan karışımları, potansiyel patlayıcı olarak işleme tabi tutulmalıdır ve gereken özen gösterilmelidir.

1.6.2.1. Ön test

Kurutulmuş madde, kurutulmuş selüloz veya odun tozu ile iyice karıştırılır. Karıştırma oranları ağırlık bazında 2 kısım test maddesi 1 kısım selüloz veya odun tozudur. Karışım, koni şeklinde bir kalıp vasıtasıyla (örneğin; çubuk tıpalı laboratuar hunisi) vurmadan sadece doldurarak koni biçimli ve 3,5 cm (taban çapı) × 2,5 cm (yükseklik) ölçülerinde bir yığın yapılır.

Yığın, soğuk, yanmaz, sızdırmaz ve ısı geçirgenliği düşük bir taban plakası üzerine yerleştirilir. Test 1.6.2.2'de olduğu gibi bir çeker ocak içerisinde gerçekleştirilir.

Tutuşturma kaynağı, yığın ile temasa sokulur. Reaksiyonun kuvveti ve süresi gözlemlenir ve kaydedilir.

Reaksiyon kuvvetli ise madde oksitleyici kabul edilir.

Sonuçlarda şüpheye açık olan herhangi bir durumla karşılaşıldığında, aşağıda belirtilen çekme testinin tamamlanması gerekmektedir.

1.6.2.2. Çekme testi

İçlerinde ağırlığa göre 10-90% oksitleyici bulunan ve oksitleyici miktarı 10% artırımlarla değişen oksitleyici-selüloz karışımları hazırlanır. Sınır durumlarında, azami yanma hızını kesin olarak elde edebilmek için ara oksitleyici-selüloz karışımları kullanılmalıdır.

Yığın, kalıp kullanılarak oluşturulur. Kalıp, metalden yapılır, 250 mm uzunluğa ve iç yüksekliği 10 mm olan ve iç genişliği 20 mm olan üçgen biçimli kesite sahiptir. Kalıbın her iki yanında boyuna doğru, üçgen kesitin üst kenarını aşarak 2 mm çıkıntı yapan yanal sınırlayıcı iki metal plaka monte edilmiştir. Karışım kalıptan biraz taşacak şekilde ve sıkıştırmadan doldurulur. Kalıp 2 cm yükseklikten sert yüzeye atıldıktan sonra fazlalık madde eğik konumlandırılan kağıt vasıtası ile sıyrılır. Yanal sınırlayıcılar çıkartılır ve geriye kalan toz bir rulo kullanılarak pürüzsüz hale getirilir. Yanmaz, sızdırmaz ve ısı geçirgenliği düşük bir taban plakası kalıbın tepesine konur, düzenek taban plakası altta kalacak şekilde döndürülür ve kalıp çıkartılır.

Yığın, hava akımının karşısına gelecek şekilde düzeltilerek çeker ocağın içine yerleştirilir.

Havalandırma hızı, dumanların laboratuar içine kaçmasını engelleyecek kadar etkin olmalıdır ve test esnasında değişiklik göstermemelidir. Düzeneğin etrafına paravan yerleştirilmelidir.

Selülozun ve test edilen bazı maddelerin su tutma özelliğinden dolayı, testler olabildiğince hızlı yapılmalıdır.

Kalıbın bir ucu alevle temas ettirerek tutuşturulur.

Reaksiyon alanı başlangıçtan 30 mm yayıldıktan sonra, 200 mm'lik mesafeyi kapsayan reaksiyon zamanı ölçülür.

Test, referans maddesi ve test maddeleri ile selülozdan oluşan karışımların herbirine en az bir kere uygulanır.

Azami yanma hızının belirgin bir biçimde referans maddesinin azami yanma hızından fazla olduğu takdirde test durdurulur. Aksi takdirde test, en fazla azami yanma hızını veren üç karışım için beşer defa tekrarlanmalıdır.

Test sonuçları pozitif hata oluşturacak sonuç verdiğinden şüphelenildiğinde, test, selülozun yerine aynı partikül büyüklüğüne sahip inert bir madde örneğin kiselgur ile yeniden yapılır. Alternatif olarak, en hızlı yanma hızı veren karışım inert atmosferde (% 2 ,v/v, den küçük oksijen içeriği) yeniden test edilmelidir.

2. VERİ

Güvenlik nedenlerinden dolayı azami yanma hızının - ortalama değeri değil – test edilen maddenin oksitleyici özelliklerinin karakteristiği olduğu kabul edilir.

Belirlenen karışımın altı testi esnasında elde edilen en yüksek yanma hızı değeri değerlendirme için uygundur.

Her karışımın en yüksek yanma hızı ile buna karşı gelen oksitleyici konsantrasyonları kullanılarak bir grafik çizilir. Bu grafikten azami yanma hızı bulunur.

Azami yanma hızına sahip karışıma yapılan test serisinde ölçülen altı yanma hızı değeri, yanma hızlarının aritmetik ortalamasından %10'dan daha fazla farklı olmamalıdır. Bunun tersi olduğu takdirde öğütme, eleme ve karıştırma işlemleri daha iyi hale getirilmelidir.

Elde edilen azami yanma hızı, referans karışımın azami yanma hızı ile karşılaştırılır (bakınız 1.3).

Testler inert atmosferde yapıldıysa, elde edilen azami reaksiyon zamanı, inert atmosferdeki referans karışım ile karşılaştırılır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- test edilen maddenin, tanımı, bileşimi, saflığı, nem içeriği ve benzeri,
- test örneğine yapılan her işlemi (örneğin: öğütme, kurutma, ...),
- testlerde kullanılan tutuşturma kaynağı,

- ölçümlerin sonuçları,
- reaksiyonun şekli (örneğin: yüzeyde ani yanıp sönmesi, bütün kütle boyunca yanması, yanma ürünleri hakkında her türlü bilgi, ...),
- yanma kuvvetinin tarifi (örneğin: alev alev yanma, kıvılcımlanarak yanma, buhar çıkartarak yanma, yavaşça için için yanma) ile test ve referans maddesinin ön güvenlik/gözlem testinde yarattığı tahmini süre dahil olmak üzere, sonuçların doğru yorumlanabilmesi için her türlü ilave açıklamalar,
- varsa, inert madde ile yapılmış testlerin sonuçları,
- varsa, inert atmosferde yapılmış testlerin sonuçları.

3.2. Sonuçların yorumu

Bir madde aşağıda bulunan koşulları yerine getiriyor ise oksitleyici madde kabul edilir:

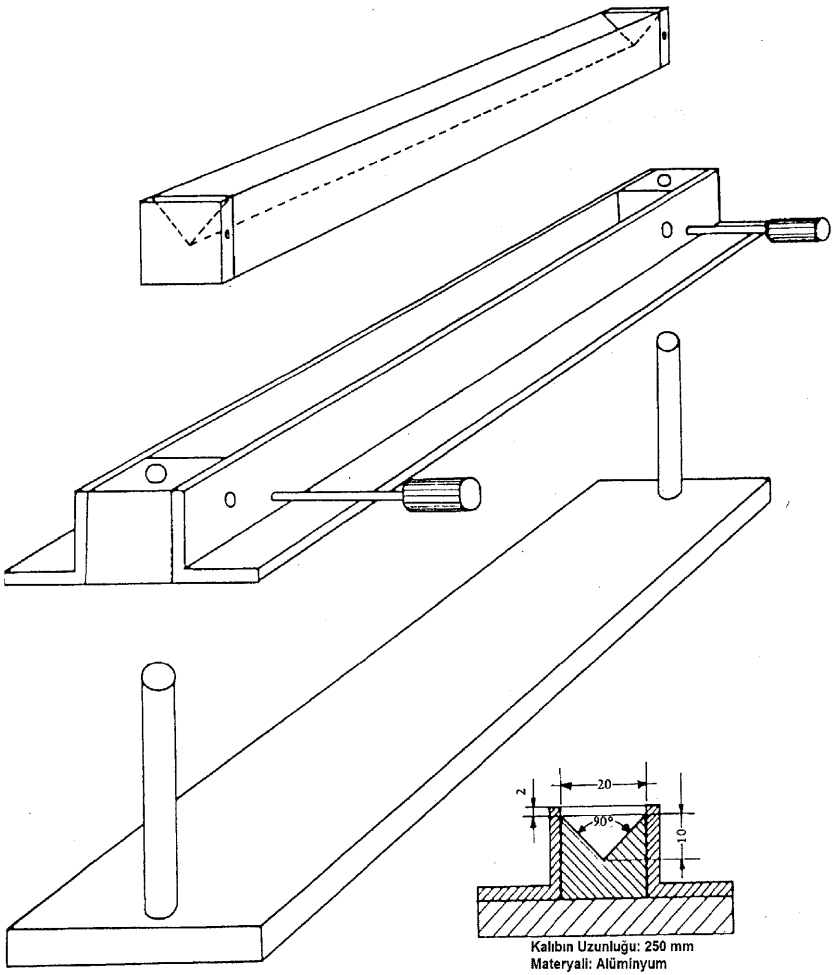
(a) Ön testte kuvvetli reaksiyon varsa,
(b) Tam testle test edilen karışımın azami yanma hızı, selüloz-baryum nitrattan oluşan referans karışımının azami yanma hızına eşitse ya da daha yüksekse.

Sonuçlar değerlendirilirken, pozitif hata oluşmasını engellemek amacıyla, test edilen madde inert materyal ile karıştırıldığında ve/ veya inert atmosferde test edildiğinde bu durum dikkate alınmalıdır.

4. KAYNAKLAR

(1) NF T 20-0335 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

Ek-I



Şekil: Yığının hazırlanması için kullanılan kalıp ve gereçleri (Bütün boyutlar milimetre cinsinden)

A.18. POLİMERLERDE SAYICA-ORTALAMA MOLEKÜL AĞIRLIĞI VE MOLEKÜL AĞIRLIĞI DAĞILIMI

1. YÖNTEM

Bu Jel Geçirgenlik Kromatografisi yöntemi, OECD TG 118 (1996)'nın bir benzeridir. Temel ilkeler ve ilave teknik bilgiler, kaynaklar kısmında verilmiştir (1).

1.1. Giriş

Polimerlerin çok çeşitli özellikleri olduğundan, ayırma koşullarını ve polimerlerin ayrılması sırasında meydana gelen tüm özellikleri ve sonuçları içine alan değerlendirmeyi çok hassas bir şekilde ortaya koyan tek bir yöntem tanımlamak imkansızdır. Özellikle de karmaşık polimer sistemleri Jel Geçirgenlik Kromatografisi'ne (GPC) uygun değildir. GPC'in uygulanabilir olmadığı durumlarda,molekül ağırlığı diğer yöntemlerle belirlenebilir (bakınız Ek). Bu gibi durumlarda, kullanılan yöntemle ilgili tüm detaylar ve gerekçeler verilmelidir.

Yöntem DIN Standard'ı 55672'ye dayanılarak tanımlanmıştır (1). Deneylerin nasıl yapılacağı ve verilerin nasıl değerlendirileceğiyle ilgili detaylar bu DIN Standardında bulunabilir. Deney koşullarının iyileştirilerek düzeltilmelerinin gerekli olduğu durumlarda bu değişiklikler gerekçelendirilmelidir.

Eğer tam olarak kaynak gösterilirse, diğer standardlar da kullanılabilir. Tanımlanan yöntemde kalibrasyon için bilinen çoklu dağılımlı polistiren örnekleri kullanılır ve yöntemin suda çözünen ve uzun zincirli dallanmış polimerler gibi belli polimerlere de uygun olabilmesi için değiştirilerek iyileştirilmesi gerekebilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Sayıca-ortalama molekül ağırlığı Mn ve ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı Mw aşağıdaki denklemler kullanılarak belirlenir:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i x M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

burada,

H_i: alıkonma hacmi V_i için, taban çizgisinden gelen alıcı sinyal seviyesi,
M_i: polimerin alıkonma hacmindeki, V_i, molekül ağırlığı,
n: alınan veri sayısıdır.

Sistem dağılımının bir ölçüsü olan molekül ağırlığı dağılımının genişliği, Mw/Mn oranı ile verilir.

1.3. Referans madde

GPC bağıl bir yöntem olduğundan, kalibrasyon yapılmalıdır. Bunun için, dar molekül ağırlığı dağılımına sahip, düz yapılı, bilinen ortalama moleküler ağırlıklı, Mn ve Mw ve bilinen molekül ağırlığı dağılımına sahip polistiren standardlar kullanılır. Numunenin ve standartların ayrılması için seçilen koşullar aynıysa, kalibrasyon eğrisi sadece bilinmeyen numunenin molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılabilir.

Molekül ağırlığı ve elüsyon zamanı arasında belirlenen ilişki, sadece söz konusu deneyin özel koşulları altında geçerlidir. Bu koşullar, yukarıdakilerin tümünü, sıcaklığı, çözücüyü (veya çözücü karışımını), kromatografi koşullarını ve ayırma kolonunu veya kolonların sistemini içerir.

Numunenin bu şekilde belirlenen molekül ağırlıkları, bağıl değerlerdir ve 'polistiren eşdeğeri molekül ağırlıkları'olarak tanımlanır. Bu da, numune ve standartlar arasındaki yapısal ve kimyasal farklılıklara bağlı olarak, molekül ağırlıklarının mutlak değerden daha büyük veya daha küçük değerlere sapabileceği anlamına gelir. Polietilen glikol, polietilen oksit, polimetil metakrilat, poliakrilik asit gibi diğer standartlar kullanılırsa, gerekçe belirtilmelidir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Hem numunenin molekül ağırlığı dağılımı hem de ortalama molekül ağırlıkları (Mn, Mw), GPC kullanılarak belirlenebilir. GPC, sıvı kromatografisinin özel bir türüdür, numune her bir bileşenin hidrodinamik hacimlerine göre ayrılır (2).

Ayrılma, numunen, tipik olarak organik jel gibi gözenekli bir malzeme ile doldurulmuş olan kolondan geçişinden etkilenir. Küçük moleküller gözeneklere nüfuz ederken, büyük moleküller gözeneklerin dışında kalırlar. Bu yüzden büyük moleküllerin yolu daha kısadır ve ilk önce büyük moleküller kolondan çıkar. Orta büyüklükteki moleküller bazı gözeneklere nüfuz ederler ve daha sonra kolondan ayrılırlar. Jelin gözeneklerinden daha küçük bir ortalama hidrodinamik çapa sahip olan en küçük moleküller, tüm gözeneklere nüfuz edebilirler. En küçük moleküller en son olarak kolondan alınırlar.

İdeal bir çözeltide ayrılma tamamen moleküllerin büyüklüğüne göre gerçekleşir, fakat pratikte en azından bazı absorpsiyon etkilerinden kaçınmak mümkün değildir. Kolonun düzensiz olarak sıkıştırılması ve ölü hacimlerin varlığı durumu daha da zorlaştırabilir (2).

Tespit, numunenin refraktif indis veya UV absorpsiyonundan etkilenir ve basit bir dağılma eğrisi elde edilir. Bununla birlikte, mevcut molekül ağırlık değerlerini eğrilere geçirmek için bilinen molekül ağırlığında ve ideal olarak yapıca çeşitli polistiren standartlarına kabaca benzeyen polimerler geçirilerek kolon kalibre edilmelidir. Tipik olarak Gauss eğrisinin sonuçları, bazen küçük bir bağ ile küçük molekül ağırlığı tarafına, kolonda yürütülen çeşitli molekül ağırlıklı türlerinin ağırlık olarak miktarını gösteren dikey eksene ve log molekül ağırlığı gösteren yatay eksene doğru, eğrilir.

1.5. Kalite kriterleri

Elüsyon hacminin tekrarlanabilirliği (Bağıl Standart Sapma: RSD) % 0.3'den daha iyi olmalıdır. Eğer bir kromatogram zamandan bağımsız olarak değerlendirilmişse ve yukarıda

belirtilen ölçütlere uymuyorsa, analiz için gerekli olan tekrarlanabilirliğin iç standardla düzeltme yapılarak sağlanması gerekir (1). Çoklu dağılım standardların molekül ağırlıklarına bağlıdır. Polistiren standardlarının söz konusu olduğu durumlarda tipik değerler aşağıdaki gibidir:

$M_p < 2000$	$M_w/M_n < 1.20$
$2000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1.05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1.20$

(M_p, en yüksek tepe noktası, standardın molekül ağırlığı)

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Standard polistiren çözeltilerinin hazırlanması

Polistiren standartlar, seçilen yürütme çözücüsü içinde dikkatlice karıştırılarak çözünürler. Çözeltiler hazırlanırken üreticinin tavsiyeleri dikkate alınmalıdır.

Seçilen standard derişimleri, enjeksiyon hacmi, çözeltinin viskositesi ve analitik dedektörün hassasiyeti gibi çok çeşitli faktörlere bağlıdır. En fazla enjeksiyon hacmi, aşırı yüklemeden kaçınmak için, kolonun uzunluğuna göre ayarlanmalıdır. 30 cm x 7.8 mm'lik kolon kullanılan GPC gibi analitik ayırmalarda tipik enjeksiyon hacmi 40 ile 100 µl arasındadır. Daha yüksek hacimler de söz konusudur ancak 250 µl'yi geçmemelidir. Enjeksiyon hacmi ve konsantrasyon arasındaki en uygun oran kolonun kalibrasyonundan önce belirlenmelidir.

1.6.2. Numune çözeltisinin hazırlanması

Temelde, numune çözeltilerinin hazırlanmasına da aynı gereklilikler uygulanır. Numune tetrahidrofuran (THF) gibi uygun bir çözeltide dikkatlice çalkalanarak çözülür. Hiçbir koşulda ultrasonik banyo kullanılarak çözülmemelidir. Gerekli olduğunda numune çözeltisi gözeneklerinin büyüklüğü 0.2 ile 2 µm arasında olan membran bir süzgeçle saflaştırılır.

Çözünmeyen partiküllerin varlığının yüksek molekül ağırlıklı türlere bağlı olabileceği sonuç raporlarında belirtilmelidir. Çözünmeyen partiküllerin ağırlık yüzdesini belirlemek için uygun bir yöntem kullanılmalıdır. Çözeltiler 24 saat içinde kullanılmalıdır.

1.6.3. Düzenek

- çözücü haznesi
- çözünmüş gazı uzaklaştırıcı (uygunsa)
- pompa
- sinyal sönümleyici (pulse dampener) (uygunsa)
- enjeksiyon sistemi
- kromatografi kolonları
- dedektör (alıcı)
- akışmetre (uygunsa)
- veri kaydedici-işlemci
- atık kabı

GPC sisteminin, numunenin THF çözücüsü için çelik kılcal borular kullanılarak, kullanılan çözeltilere karşı inert olması sağlanmalıdır.

1.6.4. Enjeksiyon ve çözücü dağıtım sistemi

Belirlenen miktardaki örnek çözelti ya otomatik örnekleyici kullanılarak ya da elle kesin olarak belirlenmiş bölgeden kolona yüklenir. Eğer elle yapılıyorsa, enjektörün pistonunu çok hızlı olarak bastırmak veya geri çekmek, gözlenen molekül ağırlık dağılımında değişikliklere neden olabilir. Çözücü dağıtım sisteminin, olabildiğince, sinyalden bağımsız olması, ideal olarak bir sinyal sönümleyiciyle bir arada olması gerekir. Akış hızı 1 ml/min olmalıdır.

1.6.5. Kolon

Numuneye bağlı olarak, polimer basit bir kolon ya da sıralı birkaç kolon kullanılarak belirlenebilir. Tanımlanan özelliklerde (numunenin gözenek büyüklüğü, büyüklük sınırları) bir seri gözenekli kolon malzemesi ticari olarak mevcuttur. Ayırma jelinin veya kolon uzunluğunun seçimi hem numunenin özelliklerine (hidrodinamik hacimler, molekül ağırlığı dağılımı) hem de çözücü, sıcaklık ve akış hızı gibi özel ayırma koşullarına bağlıdır (1)(2)(3).

1.6.6. Teorik plakalar

Ayırma için kullanılan kolon veya ard arda bağlanmış kolonlar teorik tabaka sayılarıyla tanımlanırlar. Bu, elüsyon (eleme) çözücüsü olarak THF kullanıldığında, bilinen uzunluktaki kolona etil benzen çözeltisinin veya diğer polar olmayan çözünen maddelerin yüklenmesini gerektirmektedir. Teorik plaka sayısı aşağıdaki denklemle ifade edilir:

$$N = 5.54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \text{ veya } N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

Burada,

N: teorik plaka sayısı
V_e: pik maksimumundaki elüsyon (eleme) hacmi
W: taban çizgisi pik genişliği
$W_{1/2}$: yarı pik yüksekliğindeki genişliktir.

1.6.7. Ayırma verimi

Bant genişliğini belirleyen nicelik olan teorik plaka sayısına ek olarak, ayrılma verimliliğinde rol oynayan bir kısım daha vardır ve kalibrasyon eğrisinin dikliğiyle belirlenir. Kolonun ayrılma verimliliği aşağıdaki eşitlikten elde edilir:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{kolon yüzey kesit alanı}} \geq 6.0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

burada
$V_{e,Mx}$ Mx molekül ağırlıklı polistiren için elüsyon (eleme) hacmi
$V_{e,(10.Mx)}$ on kat daha fazla molekül ağırlıklı polistiren için elüsyon (eleme) hacmi'dir.

Sistemin ayırıcılığı genel olarak aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$R_{1,2} = 2x\frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} x \frac{1}{\log_{10}(M_2 / M_1)}$$

Burada,
V_{e1}, V_{e2}: iki polistiren standard'ının pik maksimumundaki elüsyon (eleme) hacimleri
W_1, W_2: taban çizgisinin pik genişliği
M_1, M_2: pik maksimumundaki molekül ağırlıkları'dır. (10 faktör kadar birbirlerinden farklılık göstermelidirler)

Kolon sistemi R- değeri 1.7'den büyük olmalıdır (4).

1.6.8. Çözücüler

Tüm çözücüler çok yüksek saflıkta olmalıdır. (THF için %99.5 saflık kullanılır). Çözücü haznesi (eğer gerekliyse inert bir gaz atmosferinde) kolonun kalibrasyonu ve farklı örnek analizleri için yeterince geniş olmalıdır. Çözünün gazı, pompa aracılığıyla kolona taşınmadan önce alınmalıdır.

1.6.9. Sıcaklık kontrolü

Kritik iç bileşenlerin sıcaklığı (injeksiyon bölmesi, kolonlar, alıcı ve bağlantılar) sabit olmalı ve çözücü ile uygunluk göstermelidir.

1.6.10. Alıcı

Alıcının amacı elenerek kolondan uzaklaşan numunenin konsantrasyonunu kaydetmektir. Piklerin istenmeyen şekilde genişlemesinden kaçınmak için alıcı hücresinin küvet hacmi olabildiğince küçük tutulmadır. Bu hacim, ışık saçılması ve viskosite alıcıları haricinde 10 µl'den fazla olmamalıdır. Tespit için genellikle türevsel refraktometre kullanılır. Ancak, eğer numunenin veya elüsyon çözücüsünün özgün özelliklerinin gerektiği durumlarda UV/VIS, IR, viskosite alıcıları gibi diğer alıcı tipleri de kullanılabilir.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Veriler

DIN Standardına (1) verilerin toplanması ve işleme tabi tutulması için gerekenlerin yanında, değerlendirme kriterleri için de atıfta bulunulmalıdır.
Her bir numune için, iki bağımsız deney gerçekleştirilmelidir. Bunların ayrı ayrı analiz edilmeleri gerekir. Mn, Mw, Mw/Mn ve Mp her ölçüm için bulunmalıdır. Ölçülen değerlerin

kullanılan standardların molekül ağırlıklarına eşit bağıl değerler olduğunun açıkça belirtilmesi gereklidir.

Alıkonma hacimleri veya alıkonma zamanları belirlendikten sonra (muhtemelen iç standard kullanılarak düzeltilir), log Mp değerleri (Mp kalibrasyon standardının pik maksimumu) bu değerlerden birine karşılık çizilir. Onluk molekül ağırlığı başına en az iki kalibrasyon noktası ve eğrinin tamamı için numunenin tahmini molekül ağırlığını da içine alan en az beş ölçüm noktası gerekir. Kalibrasyon eğrisinin düşük molekül ağırlıklı son noktası n-hekzil benzen veya polar olmayan başka bir uygun çözünen maddeyle tanımlanır. Sayıca ortalama ve ağırlıkca ortalama molekül ağırlıkları kısım 1.2'deki formüllere dayanarak genellikle elektronik veri işlemeyle belirlenir. Verilerin elle sayısal hale getirilmesi halinde ASTM D 3536-91'e başvurulabilir (3).

Dağılım eğrisi tablo veya şekil olarak elde edilmelidir (türevsel frekans veya toplam yüzdelere karşı log M). Grafik sunumunda, bir onluk molekül ağırlığı 4 cm genişliğinde ve en fazla 8 cm pik yüksekliğinde olmalıdır. İntegral dağılım eğrisi söz konusu olduğunda y ekseninde, %0 ve %100 arasındaki fark 10 cm olmalıdır.

2.2. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

2.2.1. Test maddesi:

- test maddesiyle ilgili mevcut bilgi (kimliği, katkı maddeleri, safsızlıklar),
- numunenin nasıl muamele edildiğinin tanımlanması, gözlemler, problemler.

2.2.2. Analiz sistemi:

- eluent haznesi, inert gaz, eluentin gazının alınması,eluent bileşimi, safsızlıklar,
- pompa, sinyal sönümleyici, enjeksiyon sistemi,
- ayırma kolonları (üretici, kolonların özellikleriyle ilgili gözenek büyüklüğü, ayırma maddesinin türü vs., kullanılan kolonun uzunluğu, kullanılan kolonların sırası),
- kolonun (veya ard arda bağlanan kolon sisteminin) teorik plaka sayısı, ayırma verimliliği (sistemin ayırıcılığı),
- piklerin simetrileri hakkında bilgi,
- kolon sıcaklığı, sıcaklık kontrolünün türü,
- alıcı (ölçüm ilkesi, tür, küvet hacmi),
- eğer kullanılmışsa akışmetre (üretici, ölçüm ilkesi),
- veri kaydetme ve işleme sistemi (donanım ve yazılım).

2.2.3. Sistemin kalibrasyonu:

- kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan yöntemin detaylı tanımı,
- bu yöntemin kalite kriterleri hakkında bilgi (korelasyon katsayısı, karesel hata toplamı, vs.),
- deney işlemi boyunca yapılan tüm ekstrapolasyonlar, tahminler ve yaklaşımlarla değerlendirme ve verilerin işlenmesi hakkında bilgi,

- kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan tüm ölçümler tablo haline getirilmeli ve bu tablo her bir kalibrasyon noktası için aşağıdaki bilgileri içermelidir:
  - numunenin adı,
  - numunenin üreticisi,
  - belirme yöntemiyle birlikte standardların üretici tarafından sağlanan veya takip eden ölçümlerle türetilen karakeristik değerleri Mp, Mn, Mw, Mw/Mn,
  - enjeksiyon hacmi ve enjeksiyon derişimi,
  - kalibrasyon için kullanılan Mp değeri,
  - elüsyon hacmi veya pik maksimumunda ölçülen düzeltilmiş alıkonma zamanı,
  - pik maksimumunda hesaplanan Mp,
  - hesaplanan Mp ve kalibrasyon eğrisinin yüzde hatası.

2.2.4. Yorumlama:

- zamana bağlı değerlendirme: gerekli olan tekrarlanabilirliği sağlamak için kullanılan yöntemler (düzeltme yöntemi, iç standard vs.),
- değerlendirmenin elüsyon hacmine mi yoksa alıkonma zamanına göre mi gerçekleştirildiği bilgisi,
- eğer bir pik tamamen analiz edilememişse, değerlendirme sınırları hakkında bilgi,
- eğer kullanılmışsa, düzgünleştirme yönteminun tanımı,
- numunenin hazırlanması ve ön-muamele işlemleri,
- eğer varsa, çözünmemiş partiküllerin varlığı,
- enjeksiyon hacmi (µl) ve enjeksiyon derişimi (mg/ml),
- ideal GPC şartlarından sapmalara neden olabilecek etkilere işaret eden gözlemlerin,
- test uygulama işleminden tüm iyileştirici düzenlemelerin detaylı tanımları,
- hata aralıklarının detayları,
- sonuçların yorumlanmasına ilişkin diğer bilgi ve gözlemler.

3. KAYNAKLAR

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als
(2) Elutionsmittel, Teil 1.
(3) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
(4) 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.
(5) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polistiren by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Ek-I

Polimerler için sayıca ortalama molekül ağırlığının (mn) diğer yöntemlerle belirlenmesine ilişkin örnekler

Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) Mn tayininde, özellikle de polimer yapısıyla karşılaştırılabilir yapıya sahip bir dizi standard mevcutsa, tercih edilen yöntemdir. Ancak, GPC kullanımının pratikte getirdiği zorluklar varsa ve maddenin düzenleyici Mn kıstasları (doğrulanması gerekir) oluşturamayacağı beklentisi söz konusuysa, aşağıdaki gibi alternatif yöntemler kullanılabilir:

1. Koligatif (maddenin türüne değil tanecik sayısına bağlı) özelliklerin kullanımı

1.1 Ebüliyoskopi (Kaynama noktası ölçümü) / Kriyoskopi (Donma noktası ölçümü): Polimer eklendiğinde, çözünün kaynama noktası ve donma noktasının ölçülmesidir. Bu yöntem, çözünen polimerin, sıvının kaynama/donma noktası üzerindeki etkisinin polimerin moleküler ağırlığına bağlı olması etkisine dayanır (1) (2).

Uygulanabilirlik, Mn < 20,000.

1.2 Buhar basıncının alçalması: Seçilen bir referans sıvının bilinen miktardaki polimerin ilave edilmesinden önceki ve sonraki buhar basıncının ölçülmesidir (1) (2).

Uygulanabilirlik, Mn < 20,000 (teorik olarak; pratikte hangi sınırlayıcı değer olursa olsun).

1.3 Membran ozmometresi: Çözücü moleküllerinin yarı-geçirgen bir membran boyunca geçerken dengeye ulaşmak için doğal eğilimi seyreltikten derişik çözeltiye doğru olan, osmoz ilkesine dayanır. Testte seyreltik çözelti sıfır derişimdedir, bununla birlikte polimer, derişik olan çözeltidedir. Çözeltinin membran boyunca sürüklenmesi derişime ve polimerin molekül ağırlığına bağlı basınç farkına neden olur (1) (3) (4).

Uygulanabilirlik, Mn 20,000 - 200,000 arasında.

1.4 Buhar fazı ozmometresi: Havada asılı bulunan saf çözücü damlacıklarının buharlaştırılarak uzaklaştırılma hızının farklı en az üç derişimde havada asılı bulunan damlacıkları içeren polimer derişimlerinde karşılaştırılmasını kapsar (1) (2) (4).

Uygulanabilirlik, Mn < 20,000.

2. Uç-grup analizi
Bu yöntemi kullanmak için hem polimerin tüm yapısıyla ilgili hem de zincir sonlandırıcı uç grupların (asıl yapıdan numunenin NMR veya titrasyon/türevlendirme ile ayırt edilebilir olmalıdır) özellikleriyle ilgili bilgiye ihtiyaç vardır. Polimerde bulunan uç grupların moleküler derişimin belirlenmesi molekül ağırlığı için bir değer elde edilmesine öncülük edebilir (7) (8) (9).

Uygulanabilirlik, Mn 50,000 'e kadar (azalan güvenilirlikle).

KAYNAKLAR

(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: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
(7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

A.19 POLİMERLERİN DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIK İÇERİKLERİ

1. YÖNTEM

Bu Jel Geçirgenlik Kromatografisi yöntemi, OECD TG 119 (1996)'nın bir benzeridir. Temel ilkeler ve ilave teknik bilgiler kaynaklar kısmında verilmiştir (1).

1.1. Giriş

Polimerlerin çok çeşitli özellikleri olduğundan, ayırma koşullarını ve polimerlerin ayrılması sırasında meydana gelen tüm özellikleri ve sonuçları içine alan değerlendirmeyi çok hassas bir şekilde ortaya koyan tek bir yöntem tanımlamak imkansızdır. Özellikle de karmaşık polimer sistemleri Jel Geçirgenlik Kromatografisi'ne (GPC) uygun değildir. GPC'nin uygulanabilir olmadığı durumlarda molekül ağırlığı diğer yöntemlerle belirlenebilir (bakınız Ek). Bu gibi durumlarda kullanılan yöntemle ilgili tüm detaylar ve gerekçeler verilmelidir.

Yöntem,DIN Standardı, 55672'ye dayanılarak tanımlanmıştır (1). Deneylerin nasıl yapılacağı ve verilerin nasıl değerlendirileceğiyle ilgili detaylar bu DIN Standardında bulunabilir. Deney koşullarının iyileştirilerek düzeltilmelerinin gerekli olduğu durumlarda bu değişiklikler gerekçelendirilmelidir.

Eğer tam olarak kaynak gösterilirse, diğer standardlar da kullanılabilir. Tanımlanan yöntemde kalibrasyon için bilinen çoklu dağılımlı polistiren numuneleri kullanılır ve yöntemin suda çözünen ve uzun zincirli dallanmış polimerler gibi belli polimerlere de uygun olabilmesi için düzeltilmesi gerekebilir

1.2. Tanımlar ve birimler

Düşük molekül ağırlığı, keyfi olarak 1000 daltonun altındaki molekül ağırlığı tanımlanır. Sayıca-ortalama molekül ağırlığı Mn ve ağırlıkca ortalama molekül ağırlığı Mw aşağıdaki denklemler kullanılarak belirlenir:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i x M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

Burada,

H_i: alıkonma hacmi, V_i, için taban çizgisinden gelen alıcı sinyal seviyesi,
M_i: polimerin alıkonma hacmindeki, Vi, molekül ağırlığı
n: veri sayısıdır.

Sistemin dağılımının bir ölçüsü olan molekül ağırlığı dağılımının genişliği, M_w/M_n oranı ile verilir.

1.3. Referans maddeler

GPC bağıl bir yöntem olduğundan, kalibrasyon yapılmalıdır. Bunun için, dar molekül ağırlığı dağılımına sahip, düz yapılı, bilinen ortalama molekül ağırlıklı, Mn ve Mw, ve bilinen molekül ağırlığı dağılımına sahip polistiren standardlar kullanılır. Numunenin ve standardların ayrılması için seçilen koşullar aynıysa, kalibrasyon eğrisi sadece bilinmeyen numunenin molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılabilir.

Molekül ağırlığı ve elüsyon zamanı arasında belirlenen ilişki sadece söz konusu deneyin özel koşulları altında geçerlidir. Bu koşullar, yukarıdakilerin tümünü, sıcaklığı, çözücüyü (veya çözücü karışımını), kromatografi koşullarını ve ayırma kolonunu veya kolonların sistemini içerir.

Numunenin bu şekilde belirlenen molekül ağırlıkları, bağıl değerlerdir ve 'polistiren eşdeğeri molekül ağırlıkları'olarak tanımlanır. Bu da, numune ve standardlar arasındaki yapısal ve kimyasal farklılıklara bağlı olarak, molekül ağırlıklarının mutlak değerden daha büyük veya daha küçük değerlere sapabileceği anlamına gelir. Polietilen glikol, polietilen oksit, polimetil metakrilat, poliakrilik asit gibi diğer standardlar kullanılırsa, gerekçe belirtilmelidir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Hem numunenin molekül ağırlığı dağılımı hem de ortalama molekül ağırlıkları (Mn, Mw), GPC kullanılarak belirlenebilir. GPC, sıvı kromatografisinin özel bir türüdür, numune her bir bileşenin hidrodinamik hacimlerine göre ayrılır (2).

Ayrılma, numunenin tipik olarak organik jel gibi gözenekli bir malzemeyle, doldurulmuş olan kolondan geçişinden etkilenir. Küçük moleküller gözeneklere nüfuz ederken, büyük moleküller gözeneklerin dışında kalırlar. Bu yüzden büyük moleküllerin yolu daha kısadır ve ilk önce büyük moleküller kolondan çıkar. Orta büyüklükteki moleküller bazı gözeneklere nüfuz ederler ve daha sonra kolondan ayrılırlar. Jelin gözeneklerinden daha küçük bir ortalama hidrodinamik çapa sahip olan en küçük moleküller, tüm gözeneklere nüfuz edebilirler. En küçük moleküller en son kolondan alınırlar.

İdeal bir çözeltide ayrılma tamamen moleküllerin büyüklüğüne göre gerçekleşir fakat pratikte en azından bazı absorpsiyon etkilerinden kaçınmak mümkün değildir. Kolonun düzensiz olarak sıkıştırılması ve ölü hacimlerin varlığı durumu daha da zorlaştırabilir (2).

Tayin, numunenin refraktif indeksinden veya UV absorpsiyonundan etkilenir ve basit bir dağılma eğrisi elde edilir. Bununla birlikte, mevcut molekülerin ağırlık değerlerini eğrilere geçirmek için bilinen molekül ağırlığında ve ideal olarak yapıca çeşitli polistiren standardlara kabaca benzeyen polimerler geçirilerek kolon kalibre edilmelidir. Tipik olarak Gauss eğrisinin sonuçları, bazen küçük bir bağ ile küçük molekül ağırlığı tarafına, elenerek uzaklaşan çeşitli molekül ağırlık türlerinin ağırlığı olarak miktarını gösteren dikey eksene ve log moleküler ağırlığı gösteren yatay eksene doğru eğrilir.

Düşük molekül ağırlık içeriği bu eğriden elde edilir. Hesaplama sadece düşük molekül ağırlıklı türler, bir bütün olarak kütle bazında, polimere eşit olarak yanıt verirlerse, doğru olabilir.

1.5. Kalite kriterleri

Elusyon hacminin tekrarlanabilirliği (Bağıl Standard Sapma: RSD) % 0.3'ten daha iyi olmalıdır. Eğer bir kromatogram zamandan bağımsız olarak değerlendirilmişse ve yukarıda belirtilen ölçütlere uymuyorsa, analiz için gerekli olan tekrarlanabilirliğin iç standartdla düzeltme yapılarak sağlanması gerekir (1). Çoklu dağılım, standardların molekül ağırlıklarına bağlıdır. Polistiren standartlarının söz konusu olduğu durumlarda tipik değerler aşağıdaki gibidir:

$M_p < 2000$	$M_w/M_n < 1.20$
$2000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1.05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1.20$

(M_p, en yüksek tepe noktası molekül ağırlığı)

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Standart polistiren çözeltilerinin hazırlanması

Polistiren standardları seçilen eleme çözeltisinin içinde dikkatlice karıştırılarak çözünürler. Çözeltiler hazırlanırken üreticinin tavsiyeleri dikkate alınmalıdır.

Seçilen standard derişimleri enjeksiyon hacmi, çözeltinin viskositesi ve analitik dalıcının duyarlılığı gibi çok çeşitli faktörlere bağlıdır. En fazla enjeksiyon hacmi, aşırı yüklemeden kaçınmak için, kolonun uzunluğuna göre ayarlanmalıdır. 30 cm x 7.8 mm'lik kolon kullanılan GPC gibi analitik ayrılmalarda tipik enjeksiyon hacmi 40 ve 100 µl arasındadır. Daha yüksek hacimler de söz konusudur ancak 250 µl'yi geçmemelidir. Enjeksiyon hacmi ve konsantrasyon arasındaki en uygun oran kolonun kalibrasyonundan önce belirlenmelidir.

1.6.2. Numune çözeltisinin hazırlanması

Temelde, numune çözelti uygulanırken de aynı gereklilikler uygulanır. Numune tetrahidrofuran (THF) gibi uygun bir çözeltide dikkatlice çalkalanarak çözünür. Hiçbir koşulda ultrasonik banyo kullanılarak çözülmemelidir. Gerekli olduğunda numune çözelti gözeneklerinin büyüklüğü 0.2 ve 2 µm olan membran bir süzgeçle saflaştırılır.

Çözünmeyen partiküllerin varlığının yüksek molekül ağırlıklı türlere bağlı olabileceği sonuç raporlarında belirtilmelidir. Çözünmeyen partiküllerin ağırlık yüzdesini belirlemek için uygun bir yöntem kullanılmalıdır. Çözeltiler 24 saat içinde kullanılmalıdır.

1.6.3. Safsızlık ve katkı madde içerikleri için düzeltme

Ölçülen içerik < %1 olmadıkça polimer olmayan bileşenlerin (ör., safsızlıklar ve/veya katı maddeleri) katkıları söz konusu olduğunda, M < 1000 olan türlerin içeriklerinin düzeltilmesi genellikle gereklidir. Bu da polimer çözeltisinin veya GPC elute kısmın doğrudan analiziyle sağlanır.

Elute kısım, kolondan geçtikten sonra çok seyreltik olduğu durumlarda derişik hale getirilmelidir. Bu durum elute kısmı kuru hale getirmek için uçurma ve sonra tekrar çözme

için gerekli olabilir. Elute kısımın derişik hale getirilmesi, elenen kısımda herhangi bir değişikliğin meydana gelmemesinin sağlandığı koşullarda gerçekleştirilmelidir. Elute kısmın GPC basamağından sonra muamele edilmesi nicel belirleme için kullanılan analitik yönteme bağlıdır.

1.6.4. Düzenek

GPC düzeneği aşağıdaki bileşenlerden meydana gelir:
- çözücü haznesi
- çözücüde çözünmüş gazı uzaklaştırıcı (uygunsa)
- pompa
- sinyal sönümleyici (uygunsa)
- enjeksiyon sistemi
- kromatografi kolonları
- dedektör (alıcı)
- akışmetre (uygunsa)
- veri kaydedici-işlemci
- atık kabı

GPC sisteminin, numunenin THF çözücüsü için çelik ince borular kullanılarak, kullanılan çözeltilere karşı inert olması sağlanmalıdır.

1.6.5. Enjeksiyon ve çözücü dağıtım sistemi

Belirlenen miktardaki numune çözelti ya otomatik numuneleyici kullanılarak ya da elle kesin olarak belirlenmiş bölgeden kolona yüklenir. Eğer elle yapılıyorsa, enjektörün pistonunu çok hızlı olarak bastırmak veya geri çekmek, gözlenen molekül ağırlığı dağılımında değişikliklere neden olabilir. Çözücü dağıtım sisteminin, olabildiğince, sinyalden bağımsız olması, ideal olarak bir sinyal sönümleyiciyle bir arada olması gerekir. Akış hızı 1 ml/min olmalıdır.

1.6.6. Kolon

Numuneye bağlı olarak, polimer basit bir kolon ya da arka arkaya bağlanmış birkaç kolon kullanılarak belirlenir. Çok sayıda gözenekli kolon maddesi, gözenek büyüklüğü, eleme sınırları gibi özellikleri belirtilmiş şekilde ticari olarak mevcuttur. Ayırma jelinin veya kolon uzunluğunun seçimi hem numunenin özelliklerine (hidrodinamik hacimler, molekül ağırlığı dağılımı) hem de çözücü, sıcaklık ve akış hızı gibi özel ayırma koşullarına bağlıdır (1)(2)(3).

1.6.7. Teorik plakalar

Ayırma için kullanılan kolon veya arka arkaya bağlanmış kolonların teorik tabaka sayılarıyla tanımlanır. Bu, elüsyon çözücüsü olarak THF kullanıldığında, bilinen uzunluktaki kolona etil benzen çözeltisinin veya diğer polar olmayan çözünen maddelerin yüklenmesini kapsar. Teorik plaka sayısı aşağıdaki denklemle ifade edilir:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{veya} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

Burada,
N teorik plaka sayısı,
V_e pik maksimumundaki elüsyon (eleme) hacmi,
W pikin taban genişliği,
$W_{1/2}$yarı yükseklikteki pik genişliğidir.

1.6.8. Ayırma verimi

Bant genişliğini belirleyen nicelik olan teorik plaka sayısına ilaveten, ayrılma verimliliğinde rol oynayan bir kısım daha vardır, kalibrasyon eğrisinin dikliğiyle belirlenir. Kolonun ayrılma verimliliği aşağıdaki eşitlikten elde edilir:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{kolon yüzey kesit alan}} \geq 6.0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

Burada,
$V_{e,Mx}$ Mx: molekül ağırlıklı polistiren için elüsyon (eleme) hacmi
$V_{e,(10.Mx)}$: on kat fazla molekül ağırlıklı polistiren için elüsyon (eleme) hacmi'dir.

Sistemin ayırıcılığı yaygın olarak aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$R_{1,2} = 2x\frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2}x\frac{1}{\log_{10}(M_2 / M_1)}$$

Burada,
V_{e1}, V_{e2}: pik maksimumundaki polistiren standardının elüsyon hacimleri
W1, W_2 : pikin taban genişliği
M_1, M_2 : pik maksimumundaki molekül ağırlıkları'dır. (10 faktörle birbirlerinden farklılık gösterirler)

Kolon sistemi R- değeri 1.7'den büyük olmalıdır (4).

1.6.9. Çözücüler

Tüm çözücüler çok yüksek saflıkta olmalıdır. (THF için %99.5 saflık kullanılır). Çözücü haznesi (eğer gerekliyse inert bir gaz atmosferinde) kolonun kalibrasyonu ve farklı numune analizleri için yeterince geniş olmalıdır. Çözünün gazı pompa aracılığı ile kolona taşınmadan önce alınmalıdır.

1.6.10. Sıcaklık kontrolü

İçte yer alan kritik bileşenlerin (injeksiyon bölümü, kolonlar ve bağlantılar) sıcaklığı sabit olmalı ve çözücü seçimi ile uygunluk göstermelidir.

1.6.11. Alıcı

Alıcının amacı elenerek kolondan uzaklaşan numunenin konsantrasyonunu kaydetmektir. Piklerin istenmeyen şekilde genişlemesinden kaçınmak için alıcı hücresinin küvet hacmi olabildiğince küçük tutulmadır. Bu hacim, ışık saçılması ve viskosite alıcıları haricinde 10 µl'den fazla olmamalıdır. Belirleme için genellikle türevsel refraktometre kullanılır. Ancak, eğer numunenin veya elüsyon (eleme) çözücüsünün özel özelliklerinin gerektirdiği durumlarda UV/VIS, IR, viskosite alıcıları gibi diğer alıcı tipleri de kullanılabilir.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Veriler

DIN Standardına (1) verilerin toplanması ve işleme tabi tutulması için gerekenlerin yanında, değerlendirme kriterleri için de atıfta bulunulmalıdır.

Her bir numune için, iki bağımsız deney gerçekleştirilmelidir. Bunların ayrı ayrı analiz edilmeleri gerekir. Mn, Mw, Mw/Mn ve Mp her ölçüm için bulunmalıdır. Ölçülen değerlerin kullanılan standardların molekül ağırlıklarına eşit bağıl değerler olduğunun açıkça belirtilmesi gereklidir.

Alıkonma hacimleri veya alıkonma zamanları belirlendikten sonra (muhtemelen iç standard kullanılarak düzeltilir), log Mp değerleri (Mp kalibrasyon standardının pik maksimumu) bu değerlerden birine karşılık çizilir. Onluk molekül ağırlık başına en az iki kalibrasyon noktası ve eğrinin tamamı için numunenin tahmini molekül ağırlığını da içine alan en az beş ölçüm noktası gerekir. Kalibrasyon eğrisinin düşük molekül ağırlık son noktası n-hekzil benzen veya polar olmayan başka bir uygun çözünen maddeyle tanımlanır. Sayıca ortalama ve ağırlıkca ortalama molekül ağırlıkları kısım 1.2'deki formüllere dayanarak genellikle elektronik veri işlemeyle belirlenir. Verilerin elle sayısal hale getirilmesi halinde ASTM D 3536-91'e başvurulur (3).

Dağılım eğrisi tablo veya şekil olarak elde edilmelidir. (türevsel frekans veya toplam yüzdelere karşı log M). Grafik sunumunda, bir onluk molekül ağırlığı 4 cm genişliğinde ve en fazla 8 cm pik yüksekliğinde olmalıdır. İntegral dağılım eğrisi söz konusu olduğunda y eksenine, %0 ve % 100 arasındaki fark 10 cm olmalıdır.

2.2. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

2.2.1. Test maddesi:

- test maddesiyle ilgili mevcut bilgi (kimliği, katkı, safsızlık),
- numunenin nasıl muamele edildiğinin tanımlanması, gözlemler, problemler.

2.2.2. Analiz sistemi:

- eluent çözücüsü haznesi, inert gaz, eluent çözücüsünün gazının alınması, eluent çözücüsünün bileşimi, safsızlıklar,
- pompa, sinyal sönümleyici, enjeksiyon sistemi,
- ayırma kolonları (üretici, kolonların özellikleriyle ilgili gözenek büyüklüğü, ayırma maddesinin türü vs., kullanılan kolonun uzunluğu, çalışma durumu),
- kolonun (veya ard arda takılan kolonların) teorik plaka sayısı, ayırma verimi (sistemin ayırıcılığı),
- piklerin simetrileri hakkında bilgi,
- kolon sıcaklığı, sıcaklık kontrolünün türü,
- alıcı (ölçüm ilkesi, tür, küvet hacmi),
- eğer kullanılmışsa akışmetre (üretici, ölçüm ilkesi),
- veri işleme ve kaydetme sistemi (donanım ve yazılım).

2.2.3. Sistemin kalibrasyonu:

- kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan yöntemin detaylı tanımı,
- bu yöntemin kalite kriterleri hakkında bilgi (korelasyon katsayısı, karesel hataların toplamı, vs.),
- deney işlemi boyunca yapılan tüm ekstrapolasyonlar, tahminler ve yaklaşımlarla değerlendirme ve verilerin işlenmesi hakkında bilgi,
- kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan tüm ölçümler tablo haline getirilmeli ve bu tablo her bir kalibrasyon noktası için aşağıdaki bilgileri içermelidir:
  - numunenin adı
  - numunenin üreticisi
  - tespit yöntemiyle birlikte standardların üretici tarafından sağlanan veya takip eden ölçümlerle türetilen karakeristik değerleri Mp, Mn, Mw, Mw/Mn,
  - enjeksiyon hacmi ve enjeksiyon derişimi
  - kalibrasyon için kullanılan Mp değeri
  - elüsyon (eleme) hacmi veya pik maksimumunda ölçülen düzeltilmiş alıkonma zamanı
  - pik maksimumunda hesaplanan Mp
  - hesaplanan Mp nin yüzde hatası ve kalibrasyon eğrisi

2.2.4. Düşük molekül ağırlıklı polimer içeriği hakkında bilgi:

- analiz için kullanılan yöntemlerin tanımı ve deneylerin uygulama şekli;
- düşük molekül ağırlık türlerinin içeriklerinin tüm örneğe bağlı olarak yüzdeleri (w/w) hakkında bilgi;
- safsızlıklar, katkı maddeleri ve polimer olmayan türlerin tüm örneğe göre ağırlıkça yüzdeleri hakkında bilgi;

2.2.5. Değerlendirme

- zamana bağlı değerlendirme: gerekli olan tekrarlanabilirliği sağlamak için kullanılan yöntemler (düzeltme yöntemi, iç standart vs.),
- değerlendirmenin elüsyon (eleme) hacmine mi yoksa alıkonma zamanına göre mi gerçekleştirildiği bilgisi,

- eğer bir pik tamamen analiz edilememişse, değerlendirme sınırları hakkında bilgi,
- eğer kullanılmışsa, düzgünleştirme yönteminun tanımı,
- numunenin hazırlanması ve ön-muamele işlemleri,
- eğer varsa, çözünmemiş partiküllerin varlığı,
- enjeksiyon hacmi (µl) ve enjeksiyon derişimi (mg/ml),
- ideal GPC profilinden sapmalara neden olabilecek etkilere işaret eden gözlemlerin,
- test uygulama işlemlerindeki tüm iyileştirme için yapılanların detaylı tanımları,
- hata aralıklarının detayları,
- sonuçların yorumlanmasına ilişkin diğer bilgi ve gözlemler.

3. KAYNAKLAR

(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.

Ek-I

Çözünmeyen polimerin varlığında düşük moleküler içeriğinin doğrulanması için yol gösterme

Eğer numunede çözünmeyen polimer mevcutsa, GPC analizi sırasında kütle kaybı olur. Çözünmeyen polimer geri dönüşümsüz olarak kolonda veya numune süzme ünitesinde alıkonur, bu arada numunenin çözünen kısmı kolondan geçer. Polimerin kırılma indisi artışının (dn/dc) tahmin edilebildiği ya da ölçüldüğü durumlarda, numunenin kolondaki kütle kaybı tahmin edilebilir. Böyle durumlarda, bilinen derişimlerdeki standard maddelerin harici kalibrasyonu ve kullanılarak düzeltme yapılır ve refraktometre cevabını kalibre etmek için dn/dc kullanılır. Buradaki numunete poli(metilmetakrilat) standardı kullanılmıştır.

Akrilik polimerlerin analizindeki dış kalibrasyonda, tetrafuran içinde bilinen derişimde bir pMMA standardı GPC ile analiz edilir ve elde edilen veriler eşitliğe göre refraktometre sabitini bulmak için kullanılır.

$K = R / (C \times V \times dn/dc)$

burada:
K: refraktometre sabiti (mikrovolt·saniye/ml olarak),
R: pMMA standardının cevabı (mikrovolt·saniye olarak),
C: pMMA standardınınderişimi (mg/ml olarak),
V: enjeksiyon hacmi (ml olarak) ve
dn/dc: tetrahidrofurandaki pMMA için (ml/mg olarak), kırılma indisi artışı'dır.

Aşağıdakiler pMMA standardı için tipik verilerdir:

R = 2937891
C = 1.07 mg/ml
V = 0.1 ml
dn/dc = 9 x 10-5 ml/mg

Ortaya çıkan K değeri, 3.05 x 1011 daha sonra, eğer enjekte edilen polimerin % 100'ü alıcı boyunca elute edilerek uzaklaşmışsa, teorik alıcı cevabının hesaplanmasında kullanılır.

A.20 POLİMERLERİN SUDAKİ ÇÖZELTİ/EKSTRAKSİYON DAVRANIŞLARI

1. YÖNTEM

Tarif edilen yöntem OECD TG 120 (1997)'nin gözden geçirilmiş uyarlamasının benzeridir. Daha fazla teknik bilgi kaynaklar bölümünde verilmiştir(1).

1.1. Giriş

Emülsiyon polimerleri gibi belli polimerler için, düzenlenen yöntem kullanılmadan önce ön hazırlık çalışmasının yapılması gerekebilir. Yöntem, sıvı polimerlere ve test koşulları altında suyla reaksiyona giren polimerlere uygulanmaz.

Yöntem, pratik veya uygulanabilir olmadığında, çözelti/ekstraksiyon davranışı diğer yöntemlerle araştırılabilir. Böyle durumlarda kullanılan yöntemle ilgili tüm detaylar ve gerekçe belirtilmelidir.

1.2. Referans maddeler

Yok

1.3. Test yönteminin ilkesi

Polimerlerin sulu ortamlardaki çözelti/ekstraksiyon davranışı aşağıda tanımlanan eklemelerle birlikte, cam kap yöntemi kullanılarak belirlenir (bakınız A.6 Suda Çözünürlük, Cam Kap Yöntemi)

1.4. Kalite kriterleri

Yok.

1.5. Test yönteminin tanımlanması

1.5.1. Düzenek

Yöntem için aşağıdaki teçhizatlar (donanımlar) gereklidir:

- kırıcı alet, numunenin bilinen büyüklükteki partiküllerin elde edilmesi için öğütücü
- sıcaklık kontrollü çalkalama düzeneği
- membran süzme sistemi
- uygun analitik teçhizat
- standardlaştırılmış elekler

1.5.2. Numune hazırlanması

Temsili bir numunenin parçacık büyüklüğü ilk önce uygun elekler kullanılarak, 0.125 ve 0.25 mm arasına getirilmelidir. Numunenin kararlılığı veya öğütme işlemi için soğutmak gerekebilir. Kauçuk yapıdaki malzemeler sıvı azot sıcaklığında kırılabilir (1). Eğer gerekli olan büyüklük kısmı elde edilemiyorsa, parçacık büyüklüğünü mümkün olduğunca küçültmek

için harekete geçilmeli ve sonuç rapor edilmelidir. Raporda, parçalanan numunenin, test öncesinde nasıl saklandığının belirtilmesi gerekir.

1.5.3. İşlem

Test maddesinden 10'ar gramlık üç numune tartılır ve cam kapaklı kaplara yerleştirilir. Her bir kaba 1000 ml su ilave edilir.Eğer 10 g polimerin numunelenmesi pratik olmayacaksa, mümkün olan en yüksek miktar alınmalı ve kullanılacak su miktarı buna göre ayarlanmalıdır.

Kaplar sıkıca kapatılır ve sonrasında 20 °C'de karıştırılır. Sabit sıcaklıkta çalışabilen çalkalama veya karıştırma aleti kullanılmalıdır. 24 saat sonra, her bir kabın içeriği santrifüjlenir veya süzülür ve polimerin temiz sulu fazdaki derişimi uygun bir analitik yöntem kullanılarak belirlenir. Eğer sulu faz için uygun bir analitik yöntem yoksa, süzülen kalıntının veya santrifüjlenen çökeltinin kuru ağırlığından toplam çözünürlüğü/özütlenebilen miktarı tahmin edilebilir.

Bir taraftan safsızlıklar ve katkı maddeleri arasındaki miktar ayrımı yapmak diğer taraftan düşük molekül ağırlıklı türleri belirlemek gereklidir. Gravimetrik tayin durumunda, deneysel işlemlerden kaynaklanan atıkları belirlemek için test maddesi kullanılmayan tanık analizinin yapılması da önemlidir.

Polimerlerin 37 °C'deki suda pH 2 ve pH 9'daki çözelti/ekstraksiyon davranışları, 20 °C'de yürütülen deney için tanımlandığı şekilde belirlenebilir. pH değerleri, uygun tampon çözeltiler veya hidroklorik asit, asetik asit, analitik saflıktaki sodyum potasyum hidroksit veya NH_3 gibi uygun asit ve bazlar kullanılarak ayarlanır.

Kullanılan analiz yöntemlerine bağlı olarak, bir veya iki test uygulanmalıdır. Polimer içeriğinin sulu fazda doğrudan analizi için yeterince özgün yöntem varsa, yukarıda tanımlandığı gibi bir yöntem yeterlidir. Ancak böyle yöntemler mevcut değilse ve polimerin çözelti/ekstraksiyon davranışının belirlenmesi, sulu ekstraktın sadece toplam organik karbon içeriğinin (TOC) belirlendiği dolaylı bir analizle sınırlıysa ilave test yapılmalıdır. Bu ilave test, üç tekrarlı olarak, on kat daha küçük polimer numuneleri kullanılarak ve ilk testte kullanılan miktarda su kullanılarak yapılmalıdır.

1.5.4. Analizler

1.5.4.1. Tek bir numune boyutu ile yürütülen test

Sulu fazdaki polimer içeriklerinin doğrudan analizleri için yöntemler mevcut olabilir. Alternatif olarak, çözünen kısımların toplam içeriğini belirleyerek ve polimer olmayan tür içerikleri için düzelterek yapılan çözünen/ekstrakte edilen polimer bileşenlerinin dolaylı analizleri de düşünülebilir.

Bütün polimerik türler için sulu faz analizi, aşağıdaki hassas yöntemlerin biriyle mümkündür:

- TOC da kullanılan persülfat veya dikromat ile parçalama işlemi yoluyla CO2 eldesi IR analiz veya kimyasal analizle tahmini olarak izlenmektedir;
- silisyum veya metal içeren polimerler için Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (AAS) veya onun Endüksiyonla Çiftlenmiş Plazma (ICP) emisyon eşdeğeri;
- aromatik yapı içeren polimerler için UV absorpsiyon veya spektroflorimetri;

– düşük molekül ağırlıklı numuneler için LC-MS;
veya sulu ekstraktın kuruyana kadar vakumda uçurulması ve kalıntının spektroskopik analizleri (IR, UV, vs.) veya AAS/ICP.

Eğer sulu fazın analizi pratik olarak uygulanabilir değilse, sulu özüt, klorlu hidrokarbon gibi suda karışmayan organik bir çözücüyle ekstrakte edilmelidir. Çözücü daha sonra uçurulur ve kalıntı, belirtilen polimer için analiz edilir. Bu kalıntıdaki, katkı maddesi veya safsızlık olduğu belirlenen herhangi bir bileşen, polimerin kendisinin çözünürlük/ekstraksiyon derecesinin belirlenmesi amacıyla çıkartılmalıdır.

Bu gibi maddelerin, görece büyük miktarları söz konusuysa, safsızlıkları monomerden ve monomer türevli türden ayırabilmek için HPLC veya GC analizlerinin yapılması gerekebilir, böylece sonrakinin asıl içeriği belirlenebilir.

Bazı durumlarda kurutmak için, organik çözücünün basit şekilde buharlaştırılması ve kuru kalıntının tartılması yeterli olabilir.

1.5.4.2. İki farklı numune boyutu ile yürütülen test

Tüm sulu ekstraktlar TOC (toplam organik karbon) için analiz edilirler.

Numunenin çözünmeyen/ekstrakte olmayan kısmına gravimetrik analiz uygulanır. Eğer her bir kabın içeriğinin süzme işleminden veya santrifüjünden sonra polimer kalıntıları kabın çeperlerine yapışırsa, kap temizleninceye kadar süzüntüyle görünür tüm kalıntılardan temizleninceye kadar yıkanmalıdır. Sonrasında süzüntü tekrar santrifüj edilmeli veya süzülmelidir. Süzgeçte veya santrifüj tüpündeki kalıntılar vakum altında 40 ^{0}C'de kurutulur ve tartılır. Sabit bir ağırlığa ulaşılıncaya kadar kurutmaya devam edilir.

2. VERİLER

2.1. Tek bir numune boyutu ile yürütülen test

Üç şişenin her birinden ayrı ayrı elde edilen sonuçlar ve ortalama değer verilmeli ve çözelti hacmi başına düşen kütle (mg/l) veya polimer örneği kütlesi başına düşen kütle (mg/g) olarak ifade edilmelidir. İlave olarak, numunenin ağırlık kaybı (çözünen maddenin ağırlığının başlangıçtaki numunenin ağırlığına bölünmesiyle hesaplanır) ayrıca verilmelidir. Bağıl standard sapmalar (RSD) hesaplanmalıdır. Sayılar toplam madde (polimer + temel katkı maddeleri vs.) ve sadece polimer için (bazı var olan katkı maddeleri çıkartıldıktan sonra) ayrı ayrı hazırlanmalıdır.

2.2. İki farklı numune boyutu ile yürütülen test

İki tane üç tekrarlı deneyin sulu özütlerin ayrı ayrı TOC değerleri ve her bir deney için ortalama değer verilmeli, başlangıç numunenin ağırlığı başına düşen kütle (mgC/g) yanında, çözelti hacmi başına düşen kütle, (mgC/l), olarak ifade edilmelidir.

Düşük ve yüksek numune/su oranları sonuçları arasında hiçbir farklılık yoksa bu sonuç ekstrakte edilebilen tüm kısmın özütlendiği anlamına gelir. Böyle bir durumda doğrudan analize gerek yoktur.

Kalıntıların ayrı ayrı ağırlıkları verilmeli ve numunelerin başlangıç ağırlıklarının yüzdesi olarak ifade edilmelidir. Ortalamalar deney başına hesaplanmalıdır. 100 ve yüzdeler arasında bulunan fark orijinal numunedeki çözünebilir ve özütlenebilir maddeyi temsil eder.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıda yer alan bilgileri içermelidir:

3.1.1. Test maddesi

- test maddesi hakkında elde mevcut bilgiler (kimliği, katkı maddeleri, safsızlıklar, düşük molekül ağırlıklı türlerin içeriği).

3.1.2. Deney koşulları:

- kullanılan işlemin ve deneysel koşulların tanımı;
- analitik yöntemlerin ve tespit yöntemlerinin tanımı

Sonuçlar:
- mg/l olarak çözünen/ekstrakte olan madde sonuçları; çeşitli çözeltilerdeki ekstraksiyon testleri, polimer içeriğindeki bozulmalar ve safsızlıklar, katkı maddeleri vs için ayrı ayrı ve ortalama değerler
- polimerin mg/g'ındaki çözünen/ekstrakte olan madde sonuçları
- eğer ölçülmüşse, sulu ekstraktların TOC değerleri, çözünen maddenin ağırlığı ve hesaplanan yüzdeler
- her bir numunenin pH'ı
- tanık değerler hakkında bilgi
- gerekli olduğunda, hem testin uygulanma süresi hem de analitik işlem boyunca test maddesinin kimyasal kararsızlığına atıflar
- sonuçların değerlendirilmesi için önemli olan tüm bilgiler

4. KAYNAKLAR

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fur Prufzwecke.

A.21. OKSİTLEYİCİ ÖZELLİKLER (SIVILAR)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu test yöntemi sıvı maddelerin, yanıcı maddelerin yanma hızını veya yanma yoğunluğunu artırımını veya kendiliğinden tutuşan maddelerle iyice karıştırıldıkları zaman karışım oluşturma potansiyelini ölçmek için tasarlanmıştır. Bu test Birleşmiş Milletler'in (BM) oksitleyici sıvılar testi (1)'ine dayanmaktadır ve BM'nin testine eşdeğerdir. Bunun yanısıra A.21 no'lu bu test yöntemi öncelikli olarak Tehlikeli Madde ve Müstahzarların Sınıflandırılması, Ambalajlanması ve Etiketlenmesi Hakkında Yönetmelik'in gereksinimlerini karşılamak için tasarlanmıştır. Bir referans maddesi ile karşılaştırma yeterlidir. Ek referans maddeleri ile yapılacak testler ve karşılaştırmalar, test sonuçlarının başka amaçlar için kullanılması beklendiğinde gerekli olabilir.[1]

Maddenin yapısal formülü incelendikten sonra bu maddenin yanabilir malzeme ile ekzotermik tepkimeye girmeyeceği gerçekçi kuşkuların ötesindeyse bu testin uygulanması gerekmez.

Testleri uygulamadan önce maddenin herhangi bir olası patlayıcı özelliğinin olup olmadığı hakkında ön bilgiye sahip olmak yararlıdır.

Bu test, katılar, gazlar, patlayıcı ve kolay alevlenir özelliğe sahip maddeler ile organik peroksitlere uygulanamaz.

Test maddesinin Birleşmiş Milletler oksitleyici sıvılar testine (1) ait sonuçları bulunuyorsa, bu testin yapılması zorunlu değildir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Ortalama basınç yükselme zamanı, test altındaki karışımın, atmosferik basıncın üstünde 690 kPa' dan 2070 kPa'ya basınç artışı oluşturması esnasında ölçülmüş zamanların ortalamasıdır.

1.3. Referans maddeler

Referans madde olarak % 65'lik (ağırlık/ağırlık) sıvı nitrik asit (analitik saflıkta) gerekmektedir.[2]

Testleri gerçekleştirenler, gelecekte test sonuçlarının başka amaçla kullanılma ihtimalini düşünürlerse[1], isteğe bağlı olarak ilave referans maddelerle de testleri gerçekleştirmeleri uygundur[3].

---

[1]Örnek olarak BM taşıma yönetmeliklerinde olduğu gibi.

[2]Asit, testler yapılmadan önce derişiminden emin olmak amacıyla titre edilir.

[3]Örneğin, referans 1'de % 50 (ağırlık/ağırlık) perklorik acid ve % 40 (ağırlık/ağırlık) sodyum klorat kullanılmıştır

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test edilecek sıvı, lifli selülozla bire bir oranında karıştırılarak basınçlı kabın içine yerleştirilir. Karıştırma ve yerleştirme işlemi esnasında kendiliğinden tutuşma meydana gelirse ilave testlere gerek yoktur.

Kendiliğinden tutuşma gerçekleşmezse tam test uygulanır. Karışım basınçlı kabın içerisinde ısıtılır ve test altındaki karışımın, atmosferik basıncın üstünde 690 kPa' dan 2070 kPa'ya basınç artışı oluşturması esnasındaki zamanların ortalaması belirlenir. Elde edilen sonuçlar, referans madde(ler) ile selülozun bire bir oranında karıştırılmasıyla oluşturulmuş karışımın ortalama basınç artış zamanı ile karşılaştırılır.

1.5. Kalite kriterleri

Belirli bir karışımın bir seri içerisindeki altı testinin ortalama basınç artış zamanı sonuçları, altı testlik serinin ortalama basınç artış zamanının aritmetik ortalamasının %30'undan daha fazla farklı olmamalıdır. Ortalamadan %30'dan fazla farklı çıkan test sonuçları değerlendirmeye alınmamalıdır ve testler, karıştırma ve basınç kabına yerleştirme yöntemleri geliştirildikten sonra tekrarlanmalıdır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Hazırlık

1.6.1.1. Yanıcı madde

Lif uzunluğu 50 ila 250 µm arasında değişen ve ortalama çapı 25 µm [1] olan kurutulmuş selüloz yanıcı madde olarak kullanılır. Selüloz, 25 mm'den kalın olmayacak bir tabaka halinde 105 °C ta, 4 saat boyunca desikatör içerisinde soğuyana ve kullanıma hazır hale gelene kadar kurutucu madde ile tutularak sabit ağırlığına gelinceye kadar kurutulur. Kurutulmuş selülozun içerisindeki su miktarı kuru ağırlığının % 0,5'inden[2] az olmalıdır. Gerekirse kurutma zamanı bu amaca ulaşılana dek uzatılır[3]. Test boyunca aynı parti selülozdan kullanılır.

1.6.1.2. Düzenek

1.6.1.2.1. Basınç kabı

Basınç kabı gereklidir. Basınç kabı, dış çapı 60 mm, yüksekliği 89 mm olan silindirik çelikten bir kaptan oluşur (bakınız şekil 1). Ateşleme ve havalandırma tıpaları yerleştirilirken düzeneğin düzgün durmasına yardımcı olmak amacıyla kabın karşıt iki tarafı düzleştirilir (kabın kesitini 50 mm'ye düşürür). İç boşluk çapı 20 mm olan kabın herhangi ucundan bir tanesi, 19 mm uzunluğunda 1İngiliz Standard Borusu (BSO) veya onun metrik karşılığının gireceği şekilde yiv açılarak genişletilir. Yandan kol şeklinde bir basınç düşürücü, basıç kabının yuvarlak yan yüzeyine bir uçtan 35 mm mesafe ile ve düzleştirilmiş kenara 90 derece açı yapacak biçimde kabın kenarına vidalanır. Bu işlem için kullanılacak yuva 12 mm

[1] Örneğin Whatman Kolon kromatografik selüloz toz CF11, katalog No: 4021050
[2] Karl-Fisher (örneğin) titrasyonu tarafından onaylanan
[3] Alternatif olarak belirlenen su miktarına(örneğin) vakum altında 24 saat boyunca 105 derecede ısıtılarak ulaşılabilinir.

derinliğinde delinir ve yan kolun ucunda bulunan 1/2 BSO (veya metrik eşdeğeri) özelliklerine sahip civatanın uyacağı biçimde yiv açılır. Gaz sızmasını engellemek için gerekirse inert sızdırmaz conta yerleştirilir. Yan kol, basınç kabının gövdesinden 55 mm dışarıya doğru uzanır ve iç boşluğu 6 mm çapındadır. Yan kolun son tarafı, diafram tip basınç dönüştürücüyü kabul etmesi için genişletilir ve yiv açılır. Sıcak gazlardan, bozunma ürünlerinden etkilenmeyen ve 690 kPa'dan 2070 kPa'ya kadar olan basınç artış oranlarına 5 ms (mili saniye) den daha fazla olmamak kaydıyla duyarlı olan her türlü basınç ölçme aleti kullanılabilir.

Yan koldan en uzak kısımda bulunan uç, içerisinde biri tıpa gövdesinden izole edilmiş, diğeri tıpa gövdesine topraklanmış iki elektrot bulunan ateşleme tıpası ile kapatılır. Basınç kabının diğer ucu, iç boşluğu 20 mm olan tespit tapası ile yerinde tutulan patlama diski (patlama basıncı ortalama 2200 kPa) ile kapatılır. Gaz sızdırmazlığını sağlamak için gerekirse ateşleme tapası ile inert sızdırmaz conta kullanılabilinir. Takılan parçaların kullanım esnasında doğru pozisyonda durması için bir destek kaidesi (şekil 2) kullanılır. Bu genellikle 235 mm × 184 mm × 6 mm ebatlarına sahip yumuşak çelik levha ile 185 mm uzunluğunda 70 mm × 70 mm × 4 mm ebatlarında kare profili (K.P) kapsar.

Kare şekilli profilin boyuna olan karşılıklı iki kenarının, profilin herhangi bir ucuna denk gelen kısmından bir kesit kesilir, böylece yapı iki adet yassı ayağa sahip olup 86 mm'lik koruma kutusunu oluşturduğu için sorun halledilmiş olur. Bu düzayakların uç kısımları yatay olarak 60 derecede kesilir ve taban plakasına kaynaklanır. 22 mm genişliğinde 46 mm derinliğinde bir yuva oluşturmak için taban parçasının yukarı uç kısımlarının bir tarafı oyulur böylece basınç kabı kutu biçimli destek kısmına ateşleme tapası alta gelecek şekilde indirilirken yan kol bu yuvanın içine yerleşir. 30 mm genişliğinde 6 mm kalınlığında çelik bir tabaka kutu biçimindeki kısmın alt iç tarafına kaynaklanır ve ara levha vazifesi görür. İki adet 7 mm'lik kelebek başlı civata basınç kabını sıkıca yerinde tutmak için karşılıklı iki yüze yerleştirilir. Basınç kabını alttan desteklemek için iki adet 6 mm kalınlığında çelikten kesilmiş 12 mm genişliğinde çelik şeritler kutu kısmın alt kısmına destek olmak amacıyla yan parçalara kaynaklanır.

1.6.1.2.2. Ateşleme sistemi

Ateşleme sistemi, 25 cm uzunluğunda, 0,6 mm çapında ve 3,85 ohm/m dirence sahip Ni/Cr tel içerir. Tel 5 mm çapında çubuk kullanılarak bobin şeklinde sarılır ve ateşleme tapasının elektrotlarına bağlanır. Bobin şekil 3'te gösterilen görünümünden birine sahip olmalıdır. Kabın alt kısmı ile ateşleme bobininin alt ucu arasındaki mesafe 20 mm olmalıdır. Elektrotlar ayarlanabilir değilse, bobin ve kabın alt kısımları arasında bulunan ateşleme telinin uçları seramik muhafaza ile izole edilmelidir. Tel, en azından 10 A akım verebilen sabit akım güç kaynağı ile ısıtılmalıdır.

1.6.2. Testin performansı[1]

Düzenek, ateşleme tıpası kısmını destekleyen patlama diski yerinde olmadan, basınç dönüştürücüsü ve ısı kaynağı dâhil olmak üzere tamamen kurulur. Test edilecek 2,5 g sıvı, 2,5 g kurutulmuş selüloz ile cam bir beher içerisinde cam bir karıştırma çubuğu ile karıştırılır[2].

[1]Oksitleyicilerin, sellüloz ile olan karışımları potansiyel patlayıcı olarak işleme tabi tutulmalı ve buna göre elleçlenmelidir.

[2]Pratikte bu, deneme esnasında kullanılacak miktardan daha çok test edilecek sıvı, sellüloz bire bir karışımı hazırlanıp basınç kabına 5±0.1 g yerleştirmekle başarılabilinir. Karışım her deneme için taze hazırlanmalıdır.

Güvenlik nedeniyle karıştırma işlemi esnasında karışım ile testi uygulayan kişi arasında güvenlik kalkanı bulunmalıdır. Karışım, karıştırma veya doldurma işlemleri esnasında tutuşursa ilave teste gerek yoktur. Karışım, basınç kabına ufak miktarlar halinde ve ateşleme bobinin etrafını saracak ve onunla iyi teması sağlayacak biçimde hafifçe vurularak doldurulur. Doldurma işlemi esnasında bobinde biçim bozulması meydana gelmemesi önemlidir, bobinde meydana gelebilecek bozulmalar yanlış sonuçlar alınmasına neden olabilir[1]. Patlama diski yerine yerleştirilir ve tespit tapası yerine iyice vidalanır. Doldurulmuş olan kap, patlama diski üstte kalacak halde korumalı çeker ocak veya ateşleme hücresi içerisindeki ateşleme destek tutucusuna yerleştirilir. Güç kaynağı, ateşleme tapasının dış ucuna bağlanır ve 10 A akım uygulanır. Karıştırma işleminin başlaması ve güç kaynağının açılması arasındaki süre 10 dakikayı geçmemelidir.

Basınç değiştirici tarafından üretilen sinyaller, hem değerlendirme yapılabilecek hem de elde edilen basınç zaman görünümü oluşturup, bunun devamlı olarak saklanmasını sağlayabilecek uygun herhangi bir sisteme kayıt edilir. Karışım, patlama diski parçalanıncaya kadar veya en az 60 saniye geçinceye kadar ısıtılır. Patlama diski parçalanmazsa, herhangi bir basınç uygulanmasına neden olabilecek durumlara karşı ön önlemler alınarak, cihazı sökmeden önce soğumasına izin verilir. Test maddesi ve referans madde(ler) ile testler beş kez yapılır. Basıncın atmosferik basıncın üzerinde olmak kaydıyla 690 kPa'dan 2070 kPa çıkış süreleri not edilir. Basınç artış zamanlarının aritmetik ortalaması hesaplanır.

Bazı durumlarda madde basınç artışını kimyasal reaksiyon sonucu meydana getirebilir (çok yüksek veya çok düşük), bu artış maddenin oksitleyici özelliklerini tanımlanmaktadır. Bu durumlarda reaksiyonun doğasından emin olmak amacıyla selüloz yerine testler reaksiyon vermeyen bir madde ile tekrarlanmalıdır, örneğin diatomit (kiselgur).

2. VERİ

Test maddesi ve referans madde(ler)'inin basınç artış zamanları. Tepkime vermeyen madde ile testler yapıldıysa, bunların basınç artış zamanları.

2.1. Sonuçların işlenmesi

Test maddesi ve referans madde(ler)'inin ortalama basınç artış zamanları hesaplanır.
Tepkime vermeyen madde ile gerçekleştirilen (eğer gerçekleştirildiyse) testlerin ortalama basınç artış zamanları hesaplanır.

Tablo 1'de bazı sonuçlara ait örnekler yer almaktadır.

[1] Özellikle bobinin bitişik sarmalları arasında temas önlenmelidir.

Tablo 1
Sonuçlara ait örnekler [d)]

Madde [c)]	Selülozla 1:1 karışımda ortalama basınç artış zamanı (ms)
Amonyum dikromat, doygun sulu çözelti	20800
Kalsiyum nitrat, doygun sulu çözelti	6700
Demir(III) nitrat, doygun sulu çözelti	4133
Lityum perklorat, doygun sulu çözelti	1686
Magnezyum perklorat, doygun sulu çözelti	777
Nikel nitrat, doygun sulu çözelti	6250
Nitrik asit, % 65	4767 [a)]
Perklorik asit, % 50	121 [a)]
Perklorik asit, % 55	59
Potasyum nitrat,% 30 sulu çözelti	26690
Gümüş nitrat, doymuş sulu çözelti	- [b)]
Sodyum klorat, % 40 sulu çözelti	2555 [a)]
Sodyum nitrat, % 45 sulu çözelti	4133
İnert madde	-
Su:selüloz	- [b)]

a) Laboratuvar içi karşılaştırmalı denemelerden elde edilen ortalama değer
b) 2070 kPa'lık maksimum basınca ulaşılamadı
c) Doygun çözeltiler 20 derecede hazırlanmalıdır
d) Referans (1)'de bulunan BM taşıma sınıflandırma cetveline bakınız.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporları aşağıdaki bilgileri içermelidir:
-test edilen maddenin, kimliği, bileşimi, saflığı ve benzeri,
-test maddesinin derişimi,
-kullanılan selülozun kurutma işlemi,
-kullanılan selülozun içindeki su miktarı,
- ölçümlerin sonuçları,
-kullanıldıysa inert madde ile gerçekleştirilen testlerin sonuçları,
-hesaplanmış ortalama basınç artış zamanları,
-yöntemden yapılan her türlü sapmalar ve bunların nedenleri,
-sonuçların doğru yorumlanabilmesi için her türlü ek bilgi ve açıklamalar.

3.2. Sonuçların yorumu[1]

Test sonuçları aşağıda belirtilenler temel alınarak değerlendirilir:

(a) Test maddesi ve selülozdan oluşan karışımın kendiliğinden tutuşma gösterip göstermemesi ve
(b) Basıncın, 690 kPa'dan 2070 kPa'a arttığı zamanların ortalamasının, referans madde(ler)'nin sonuçları ile karşılaştırılması.

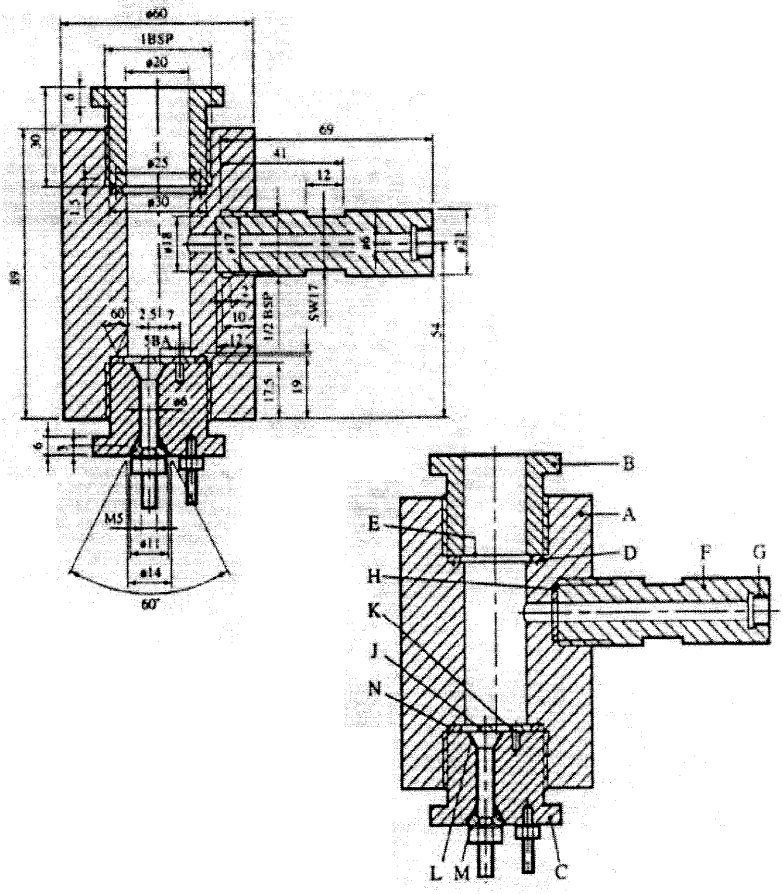
Sıvı bir madde aşağıda belirtilen durumlarda oksitleyici kabul edilir:
(a) Maddenin ve selülozun kütlece bire bir (1:1) karışımı kendiliğinden tutuşuyorsa; ya da
(b) Maddenin ve selülozun kütlece bire bir (1:1) karışımı, % 65'lik (w/w, ağırlık/ağırlık) sıvı nitrik asit ve selülozun bire bir (1:1) karışımıyla aynı veya daha düşük ortalama basınç artış zamanı gösteriyorsa.Sonuçlar değerlendirilirken, gerekirse pozitif hatayı engellemek için madde, inert malzeme ile test edildiğinde alınan sonuçlar dikkate alınmalıdır.

4. KAYNAKLAR

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

[1]BM taşıma yönetmeliklerinin içinde bulunan, çeşitli referans madde kullanıldığında sonuçların yorumlanması hakkında bilgi veren referans 1'e bakınız

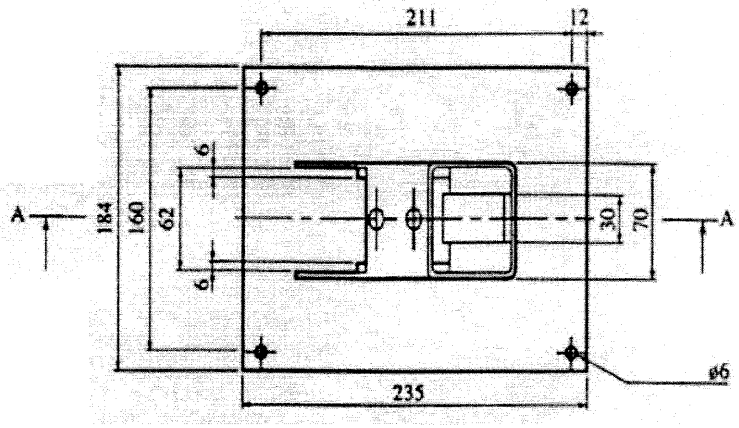
Ek-I

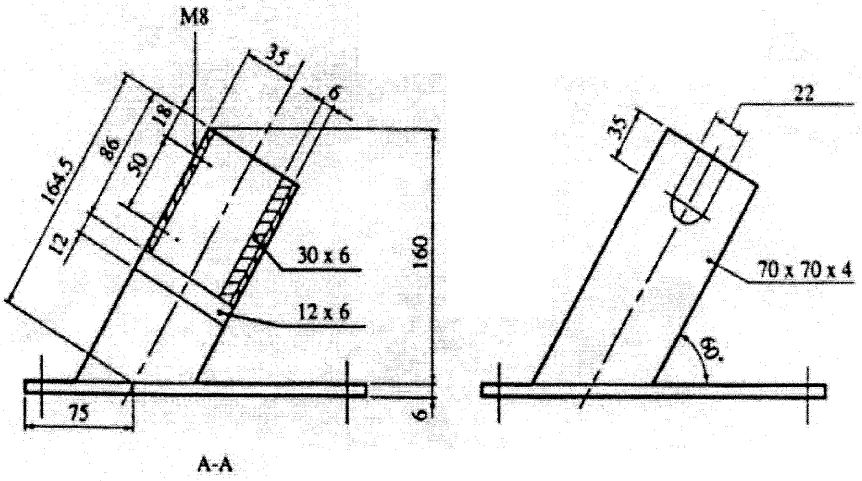


Şekil 1

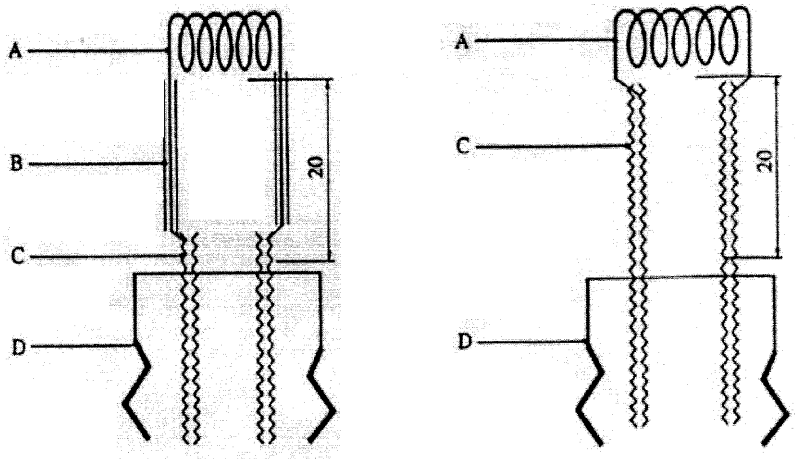
Basınç kabı

(A) Basınç kabı gövdesi
(B) Patlama diski tespit tapası
(C) Ateşleme tapası
(D) Yumuşak kurşun pul
(E) Patlama diski
(F) Yan kol
(G) Basınç değiştirici kafası
(H) Pul
(J) İzole edilmiş elektrot
(K) Topraklı elekrot
(L) İzolasyon
(M) Çelik koni
(N) Pul bozucu yiv





Şekil 2: Destek tutucu



Şekil 3: Ateşleme sistemi

(A) Ateşleme bobini (B) İzolasyon (C) Elektrotlar (D) Ateşleme tapası

Not: Bu konfigürasyonlardan herhangi birisi kullanılabilir

A.22. FİBERLERİN UZUNLUK AĞIRLIKLI ORTALAMA ÇAPLARI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntem, yığın Yapay Mineral Fiberlerin (bulk Man Made Mineral Fibres- MMMF) Uzunluk Ağırlıklı Geometrik Ortalama Çapını (LengthWeightedGeometricMeanDiameter- LWGMD) ölçmek için gerekliprosedürü tanımlar. Popülasyonun Uzunluk Ağırlıklı Geometrik Ortalama Çapı, numunenin %95 güven seviyesi (Uzunluk Ağırlıklı Geometrik Ortalama Çap ± iki standart hata) arasında olma olasılığı %95 olacağı için rapor edilen değer (test değeri), numunenin güven seviyesi olan %95 in altında olacaktır (örn. Uzunluk Ağırlıklı Geometrik Ortalama Çap – 2 standart hata). Yöntem, ECFIA ve HSE arasında Chester'da 26/9/93'te yapılan toplantıda kararlaştırılan HSE endüstri prosedür taslağının güncel (Haziran 1994) haline dayalı ve ikinci bir labaratuvarlar arası karşılaştırma deneylerinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (1, 2). Bu ölçüm yöntemi, refraktör (ateşe dayanıklı) seramik fiber (erimez seramik fiberler- RCF), yapay camsı fiber (MMVF), kristalimsi ve çok kristalli fiberleri içeren Yapay Mineral Fiberleri (MMMF) kapsayan yığın madde ya da materyallerin fiber çaplarını karakterize etmek için kullanılabilir.

Uzunluk ağırlığının belirlenmesi, materyalleri numunelerken ya da kullanırken uzun fiberlerin kırılmasından kaynaklanan çap bozulması üzerine etkiler için telafi aracıdır. Geometrik istatistikler (geometrik ortalalama), Yapay Mineral Fiberlerin (MMMF) çaplarındaki büyüklük dağılımını ölçmek için kullanılır, çünkü bu çapların genellikle log normale yakın olan büyüklük dağılımları vardır.

Çap gibi uzunluk ölçme de hem zor hem de zaman alıcıdır fakat, sadece SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) alanı görüşü üzerine son derece ince bir çizgiye değen bu fiberler ölçüldüğü takdirde verilen fiberin seçim olasılığı uzunluğu ile orantılıdır.Uzunluk ağırlığı hesaplamalarında uzunluğa dikkat ederken ihtiyaç duyulan tek ölçüm çaptır ve Uzunluk Ağırlıklı Geometrik Ortalama Çapı (LengthWeightedGeometricMeanDiameter- LWGMD-2SE) bu yöntemde açıklandığı gibi hesaplanabilir.

1.2. Tanımlar

Partikül: Uzunluk-genişlik oranının 3:1'den küçük olduğu madde.

Fiber: Uzunluk-genişlik oranının (en- boy oranı) en az 3:1olduğu bir madde.

1.3. Amaç ve sınırlar

Yöntem, medyan çap büyüklükleri 0,5 µm den 6 µm ya olan çap dağılımlarına bakmak için tasarlanmıştır. Daha büyük çaplar daha küçük SEM oranları kullanarak ölçülebilir fakat yöntem fiber dağılımlar için gittikçe sınırlandırılacaktır ve eğer çap büyüklüğü 0,5 µm den aşağıda ise transmisyon elektron mikroskop (TEM- transmissionelectronmicroscope) ölçümü tavsiye edilir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Bir takım temsili çekirdek numune, fiber örtüden ya dagevşek yığın fiberden alınır. Yığın fiberler, kırma prosedürü ile kısaltılır ve temsili bir alt numune su içinde dağıtılır. Temsili numunenin sulu çözeltisi 0,2 μm gözenek büyüklüğündeki polikarbonat filtreden geçirilir ve özütlenir ve SEM kullanarak inceleme için hazırlanır. Fiber çapları, çap büyüklüğü hakkında tarafsız bir tahmin yapabilmek için doğrusal kesişme yöntemini(lineinterceptmethod) kullanarak 10.000 kat ya da daha büyük ekran büyütmede[1] ölçülür. % 95'ten az olan güvenirlik aralığı (tek yanlı sınamaya dayanır), materyalin geometrik ortalama fiber çapının en düşük değerinin tahminini vermek için hesaplanır.

1.5. Test yönteminin açıklaması

1.5.1. Güvenlik/Önlemler

Havada uçuşan fiberlere kişisel maruz kalma, minimize edilmelidir ve kuru fiberlerin kullanımı için çeker ocak ya da havasız ortam kabini (glove box) kullanılmalıdır. Periyodik kişisel maruz kalmanın izlenmesi, kontrol yöntemlerinin etkinliğini belirlemek için gerçekleştirilir. Cilt tahrişini azaltmak ve çapraz kirlenmeyi engellemek için Yapay Mineral Fiberler taşınırken tek kullanımlık eldivenler giyilmelidir.

1.5.2. Düzenekler/Ekipman

- Pres ve boyalar (10 MPa üretim kapasitesi).
- 0,2 μmgözenek büyüklüğünde polikarbonatkapiler gözenek filtreleri (25 mm çap).
- Takviye filtre olarak kullanmak üzere 0,5 μm gözenek büyüklüğünde selüloz ester membran.
- 25 mm çapındaki filtreleri almak için (örn. Miligözenek cam mikroanaliz kiti, tip No XX10 025 00) cam süzme düzenekleri (ya da tek kullanımlık filtreleme sistemleri).
- Mikro organizmaları uzaklaştırmak için 0,2 μm gözenek büyüklüğündeki filtre ilesüzülen yeni damıtılmış su.
- Altın ya da altın/paladyum hedefleyicisi olan püskürtmeli kaplayıcı.
- 10 nm ye kadar çözünürlüğü olan ve 10 000 kat büyütme kapasitesi bulunan SEM.
- Muhtelifmalzemeler: spatulalar, Tip 24neşter, cımbız, SEM tüpleri, karbon yapışkanlar ya da karbon yapışkan bantlar, gümüş kama.
- Ultrasonik mil ya da tezgah üstü ultrasonik banyo.
- MMMF örtüsünden asıl numuneleri almak için ana numune alıcı ya da kapak burgusu.

1.5.3. Test Prosedürü

1.5.3.1. Örnekleme

Örtüler ve kurutma diskleri için, enine kesim numuneleri almak amacıyla 25 mm ana numune alıcı ya da kapak burgusu kullanılır. Eğer örtünün uzun olan kenarları mevcut ise küçük uzunluktaki örtü genişliği karşısında eşit olacak şekilde aralık bırakılmalıdır ya da rastgele alanlardan alınmalıdır. Gevşekfiberlerden rastgele numuneleri elde etmek için de aynı ekipman kullanılabilir. Yığın materyal içinde mekansal çeşitlilikleri belirtmek için mümkün olduğunda altı numune alınmalıdır.

---

[1] Bu büyütme değeri, 3 μm fiberler için belirlenir, 6 μm fiberler için × 5000 büyütme daha uygun olabilir.

Altı ana numune, 10 MPa da 50 mm çap boyası içinde ezilmelidir. Materyal spatula ile karıştırılır ve 10 MPa da tekrar pres edilir. Daha sonra materyal boyadan alınır ve yalıtılmış cam şişe içerisinde saklanır.

1.5.3.2. Numune Hazırlama

Eğer gerek görülür ise organik bağlayıcı, fiberi yaklaşık bir saat boyunca 450 °C deki fırın içerisine yerleştirerek uzaklaştırılabilir.

Numuneyi alt bölümlere ayırmak için konik şekil verilir ve dörde bölünür (bu toz kabini içerisinde gerçekleştirilebilir).

Spatula kullanarak, numunenin küçük bir miktarı (< 0,5 gr)0,2 µmmembran filtre yoluyla filtrelenmiş olan yeni damıtılmış suyun 100 ml'ne eklenir (eğer yeterli görülür ise ultra saf su kullanılabilir). 100 W güçte işletilen bir ultrasonik mil kullanaraktam dağılım gerçekleştirilir ve ayarlanır, böylece kavitasyon meydana gelir. (eğer mil kullanımı mümkün değil ise şu yöntem izlenir: birkaç defa çalkalanır ve 30 saniyeliğine ters çevrilir; beş dakika boyunca tezgah üstü ultrasonik banyo içerisinde ultrason uygulanır ve daha sonra birkaç defa çalkalanıp bir 30 saniye daha ters çevrilir).

Fiberin dağılımından sonra, geniş ağızlı pipet kullanarak (2-5 ml kapasiteli olan) birkaç temsili numunenin sulu çözeltisi hemen çıkartılır (örn. 3, 6 ve 10 ml'lik 3 temsili numunenin sulu çözeltisi).

Silindir biçimli rezervuar ile 25 mm cam filtre baca kullanarak, 5 µm gözenek MEC destekli filtre ile desteklenen 0,2 µmpolikarbonat filtre yoluyla her temsili numunenin sulu çözeltisi vakum filtrelenir. Filtre edilmiş olan damıtılmış saf suyu yaklaşık olarak 5 ml'si fırına yerleştirilmelidir ve temsili numunenin sulu çözeltisi, pipetin ucu menisküs altında tutularak su içerisine akıtılır. Pipet ve rezervuar, ince fiberlerin yüzeye daha fazla tutunma eğilimiolduğundan dolayı pipetlemeden sonra baştan sona yıkanmalıdır.

Kurutmak için bir kaba yerleştirmeden önce filtre dikkatlice çıkartılır ve destek filtreden ayrılır.

Sallama hareketi kullanarak, tip 24 neşter bıçağı ile filtrelenmiş süzüntünün filtre kısmının çeyreği ya da yarısı kesilir. Yapışkan karbon bez bant ya da karbon tutkalkullanarak, kesilen kısım, SEM çıkıntısına dikkatli bir şekilde tutturulur. Filtre ve çıkıntı kenarında elektrik kontağını geliştirmek için gümüş kama en az üç koşulda uygulanmalıdır. Yapışkan/gümüş kama kuru olduğunda, kalıntı yüzeyinin üzerine 50 nm'lik altın ya da altın/paladyum püskürtülerek kaplanır.

1.5.3.3. SEM Kalibrasyonu ve Kullanımı

1.5.3.3.1. Kalibrasyon

SEM kalibrasyonu en az haftada birkez (ideal olanı günde birkez) onaylanmış olan birkalibrasyon sistemi kullanarak kontrol edilmelidir. Eğer ölçülen değer (SEM) onaylanmış olan değerin % ± 2'sinde değil ise onaylanmış standarda karşı kalibrasyon kontrol edilmelidir ve daha sonra SEM kalibrasyonu ayarlanmalı ve tekrar kontrol edilmelidir.

SEM, 2000 kat büyütme kapasitesi olan gerçek bir numune matrisi kullanarakminimum 0,2 µm görülür çapı olanları çözebilmelidir.

1.5.3.3.2. Kullanım

SEM, örneğin her kare için 5 saniye gibi yavaş tarama hızında kabul edilebilir görüntüler ile birlikte iyi çözünürlük sağlayan koşullarda 10.000 kat büyütmede[1] çalıştırılmalıdır. Farklı SEM'lerinişletimsel gereksinimleri değişiklik göstermesine rağmen oldukça düşük atomik ağırlıktaki materyaller ile genellikle en iyi görüş ve çözünürlüğü elde etmek için küçük spot genişliği ayarları ve kısa çalışma uzaklığı ile 5-10 keV voltaj arttırılması kullanılmalıdır. Lineer travers yürütüldüğünden dolayı tekrar odaklanmayı minimize etmek için 0° eğim kullanılmalıdır ya da, eğer SEM'in doğru merkezli bir safhası var ise doğru merkezli çalışma uzaklığı kullanılmalıdır. Eğer materyal küçük (çap olarak) fiberler içermiyor ise ve fiber çapları büyük ise (> 5 µm) daha düşük büyütme kullanılabilir.

1.5.3.4. Boyutlandırma

1.5.3.4.1. Numuneyi değerlendirmek için düşük büyütme incelemesi

İlk olarak numune, büyük fiberlerin kümeleştiğine dair kanıtlara bakmak ve fiber yoğunluğunu değerlendirmek için düşük büyütmede incelenmelidir. Aşırı kümeleşme olması durumunda yeni bir numune hazırlanması tavsiye edilir.

İstatistiksel doğruluk için fiberlerin minimum sayısını ölçmek gereklidir ve yüksek fiber yoğunluğu makbul görülebilir çünkü boş alanların incelenmesi zaman kaybettirir ve analizlere herhangi bir katkısı bulunmaz. Bununla birlikte eğer filtre aşırı yüklenmişse küçük fiberler belirsiz olabileceğinden/büyük fiberler tarafından engellenebileceğinden dolayı bütün ölçülebilir fiberleri ölçmek zor hale gelebilir ve kaybolabilirler.

Uzunluk Ağırlıklı Geometrik Ortalama Çap'a aşırı değer vermeye yönelik sapma, her 150 milimetre lineer fiber traversi geçen fiber yoğunluğundan meydana gelebilir. Bunun yanısıra düşük fiber konsantrasyonlar analiz süresini arttırabilir ve düşük konsantrasyonlu filtrelerde ısrar etmek yerine optimuma yakın fiber yoğunluğu olan numune hazırlamak daha uygun maliyetlidir. Optimum fiber yoğunluk, 5000 kat büyütmede görülen her alan için yaklaşık bir ya da iki hesaplanabilir fiber ortalamasını vermelidir. Bununla beraber optimum yoğunluk fiberlerin büyüklüğüne (çap) dayanır, bu nedenle fiber yoğunluğunun optimal değere yakın olup olmadığını belirlemek amacıylabazen uzman görüşü gerekebilir.

1.5.3.4.2. Fiber çaplarının uzunluk ağırlığının belirlenmesi

Sadece SEM ekranındaki ince hat çiziğine dokunan (ya da kesişen) fiberler hesap edilir. Bu nedenle dikey (ya da yatay) hat, ekran merkezinden çekilir.

Alternatif olarak tek bir nokta ekran merkezine yerleştirilir ve filtreden tek bir yönde sürekli tarama başlatılır. Bu noktaya dokunan ya da bu noktayı kesen boy-en oranı 3:1 den daha büyük olan her fiberin çapı ölçülür ve kayıt edilir.

---

[1] 3 µm fiberler için, önceki nota bakınız.

1.5.3.4.3. Fiber boyutlandırma

Minimum 300 fiberin ölçülmesi tavsiye edilir. Her fiber, çizgi ya da görüntü üzerine çizilen nokta ile (ya da eğer fiber kenarları belirsiz ise kesişme noktasına yakın olan noktada) kesişen noktada sadece bir kez ölçülür. Eğer düzensiz enine kesitler ile karşılaşılır ise fiber ortalama çapını temsil eden bir ölçüm kullanılmalıdır. Kenar tanımlaması yaparken ve fiber kenarlar arasındaki en kısa mesafeyi ölçerken gerekli önlemler alınmalıdır.Boyutlandırma, kayıtlı görüntü ve fotoğraflarda hat üzerinde ya da devre dışı iken yapılabilir. Elektronik çizelge içerisine doğrudan veri aktarımı gerçekleştiren yarı otomatik görüntü ölçüm sistemleri tavsiye edilir, bunlar zamandan tasarruf sağladığı için kopyalama hatalarını engeller ve hesaplamalar otomatikleştirilebilir.

Bakış ölçüm alanına tekrar kıvrılmadıklarındanemin olmak amacıyla uzun fiberlerin sonu, düşük büyütmede kontrol edilmeli ve sadece bir kez ölçülmelidir.

2. VERİ

2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Fiber çaplarının genellikle normal bir dağılımı yoktur. Bununla birlikte log dönüşümü uygulanarak normale yakın olan dağılım elde etmek mümkündür.

n tane fiber çapının (D) aritmetik ortalaması (ortalama lnD) ve log standart sapmasının e tabanındaki değerleri (lnD) hesaplanır.

$$ortalama\ \ln D = \frac{\sum lnD}{n}$$

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - ortalama\ lnD)^2}{n-1}}$$

Standart sapma, standart hatayı (SE_{lnD}) elde etmek için belirtilen ölçümlerin (n) karekökü ile bölünür.

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Ortalamadan standart hata iki kez çıkarılır ve iki geometrik standart hatadan küçük geometrik ortalamayı vermek için bu değerin (iki standart hatadan küçük ortalama) üsteli hesaplanır.

$$LWGMD - 2SE = ee^{(ortalamalnD - 2SE_{lnd})}$$

3. RAPORLAMA

Test raporu

Test raporu en azından aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- LWGMD-2SE değeri.
- Özellikle uygun doğrulama ile sonuçların hassasiyeti/kesinliği ya da doğruluğu üzerine etkisi olan herhangi bir sapma.

4. KAYNAKLAR

(1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive, February 1999.

(2) G. Burdettand G. Revell. Development of a Standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive, Research and Laboratory Services Division, 1994.

BÖLÜM B:

TOKSİSİTE VE DİĞER SAĞLIK ETKİLERİNİN TAYİNİ İÇİN YÖNTEMLER

B.1 bis AKUT ORAL (AĞIZDAN) TOKSİSİTE- SABİTLENMİŞ DOZ İŞLEMİ

B.1 tris AKUT ORAL (AĞIZDAN) TOKSİSİTE- AKUT TOKSİK SINIF YÖNTEMİ

B.2 AKUT TOKSİSİTE (SOLUMA İLE)

B.3 AKUT TOKSİSİTE (DERİ YOLU İLE)

B.4 AKUT TOKSİSİTE: DERİ TAHRİŞİ /AŞINMA

B.5 AKUT TOKSİSİTE: GÖZDE AŞINMA/TAHRİŞ

B.6 CİLT HASSASİYETİ

B.7 TEKRARLI DOZ (28 GÜNLÜK) TOKSİSİTESİ (AĞIZ YOLUYLA)

B.8 TEKRARLI DOZ (28 GÜNLÜK) TOKSİSİTESİ (SOLUNUMLA)

B.9 TEKRARLI DOZ (28 GÜNLÜK) TOKSİSİTESİ (DERİ YOLUYLA)

B.10 MUTAJENİTE - IN VITRO MEMELİ KROMOZOM BOZUKLUĞU TESTİ

B.11 MUTAJENİTE -- IN VIVO MEMELİ KEMİK İLİĞİ KROMOZOM BOZUKLUĞU TESTİ

B.12 MUTAJENİTE – IN VIVO MEMELİ ERİTROSİT MİKROÇEKİRDEK TESTİ

B.13/14 MUTAJENİTE: BAKTERİ KULLANARAK TERS MUTASYON TESTİ

B.15 MUTAJENİTE TESTİ VE GEN MUTASYONU KANSEROJENİTENİN İZLENMESİ (GEN MUTASYONU)-*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16 MİTOTİK (MİTOZ ŞEKİLDE BÖLÜNME GÖSTEREN) YENİDEN BİRLEŞME (REKOMBİNASYON) -*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.17 MUTAJENİTE - IN VITRO MEMELİ HÜCRESİ GEN MUTASYONU TESTİ

B.18 DNA HASARI VE ONARIMI – MEMELİ HÜCRELERİNDE INVITRO PROGRAMLANMAMIŞ DNA SENTEZİ

B.19 IN VITRO KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ

B.20 *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DA CİNSİYETE BAĞLI ÇEKİNİK ÖLÜMCÜL TEST

B.21 IN VITRO MEMELİ HÜCRESİ DÖNÜŞÜM TESTLERİ

B.22 KEMİRGENLERDEKİ BASKIN ÖLÜMCÜL TEST

B.23 MEMELİ SPERMATOGONAL KROMOZOM BOZUKLUĞU TESTİ

B.24 FARE BENEK TESTİ

B.25 FAREDE KALITIMSAL YER DEĞİŞTİRME (TRANSLOKASYON) TESTİ

B.26 ORAL SUB-KRONİK ORALTOKSİSİTE TESTİ - KEMİRGENLERDE TEKRARLANAN DOZDA 90 – GÜNLÜK ORAL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI

B.27 SUB-KRONİK ORAL TOKSİSİTE TESTİKEMİRGENLER DIŞINDA 90 – GÜN TEKRARLI DOZ ORAL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI

B.28 SUB -KRONİK DERMAL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI KEMİRGEN TÜRLER KULLANILARAK 90-GÜN TEKRARLI DERMAL DOZ ÇALIŞMASI

B.29 SUB –KRONİK SOLUNUM TOKSİSİTE ÇALIŞMASI KEMİRGEN TÜRLERİ KULLANILARAK 90-GÜN TEKRARLI SOLUNUM DOZ ÇALIŞMASI

B.30 KRONİK TOKSİSİTE TESTİ

B.31 PRENATAL GELİŞİMSEL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI

B.32 KANSEROJENİTE TESTİ

B.33 BİRLEŞTİRİLMİŞ KRONİK TOKSİSİTE/KANSEROJENİTE TESTİ

B.34 TEK NESİLLİ ÜREME TOKSİSİTESİ TESTİ

B.35 İKİ NESİLLİ ÜREME TOKSİSİTESİ ÇALIŞMASI

B.36 TOKSİKOKİNETİK

B.37 ORGANOFOSFORLU MADDELERİN AKUT MARUZ KALMANIN ARDINDAN GECİKMİŞ NÖROTOKSİSİTE ÇALIŞMASI

B.38 ORGANOFOSFORLU MADDELERİN GECİKMİŞ NÖROTOKSİSİTE 28 GÜN TEKRARLI DOZ ÇALIŞMASI

B.39 MEMELİ KARACİĞER HÜCRELERİNDE IN VIVO PROGRAMLANMAMIŞ DNA SENTEZİ (UDS) TESTİ

B.40 CİLTTE AŞINMA

B.41 İN VİTRO 3T3 NRU FOTOTOKSİSİTE TESTİ

B.42 CİLT DUYARLILIĞI: BÖLGESEL LENF DÜĞÜMÜ YÖNTEMİ

B.43 SIÇANLARDA NÖROTOKSİSİTE ÇALIŞMASI

B.44 DERİ ABSORPSİYONU: İN VİVO YÖNTEMİ

B.45 DERİ ABSORPSİYONU: İN VİTRO YÖNTEMİ

B.46 İN VİTRO CİLT TAHRİŞİ: YENİDEN YAPILANDIRILMIŞ İNSAN EPİDERMİ MODEL TESTİ

B.47 OKÜLER AŞINDIRICILAR VE CİDDİ TAHRİŞ EDİCİLERİ TEŞHİS İÇİN SIĞIR KORNEASI OPAKLIĞI VE GEÇİRGENLİĞİ TEST YÖNTEMİ

B.48 OKÜLER AŞINDIRICILAR VE CİDDİ TAHRİŞ EDİCİLER TEŞHİS İÇİN İZOLE TAVUK GÖZÜ TEST YÖNTEMİ

GENEL GİRİŞ

A. TEST MADDESİNİN TANIMLANMASI

Test maddesinin ana safsızlıkları içeren bileşimi ve kararlılığı içeren ilgili fizikokimyasal özellikleri, toksisite çalışmasına başlanılmadan önce bilinmelidir.
Test maddesinin fizikokimyasal özellikleri uygulama yolunun seçimi, her bir özel çalışmanın tasarımı ve test maddesinin elleçlenmesi ve depolanması için önemli bilgi sağlar.
Dozun uygulandığı ortamda ve biyolojik örneklerde test maddesinin (mümkünse ana safsızlıkları da içeren) nitel ve nicel olarak belirlenmesi için analitik yöntemin geliştirilmesi çalışmadan önce gerçekleştirilmelidir.
Tanımlama, fizikokimyasal özellikler, saflık, test maddesinin davranışı ile ilgili tüm bilgiler test raporunda belirtilmelidir.

B. BU EKTEKİ YÖNTEMLERDE KULLANILAN TERİMLER İÇİN GENEL TANIMLAR

(İ) Akut Toksisite, maddenin tek bir dozunun uygulamasından sonra, belirli bir zamandaki (çoğunlukla 14 gün) gerçekleşen olumsuz etkileri kapsar.
(ii) Belirgin Toksisite, test maddesinin uygulanmasını takiben, toksisitenin açık belirtilerini tanımlayan genel bir terimdir. Bu zararların değerlendirilmesi için yeterli olmalı ve uygulanan dozdaki artışın şiddetli toksisite belirtileri ve olası ölüm ile sonuçlanması beklenir.
(iii) Doz, uygulanan test maddesi miktarıdır. Doz, ağırlık olarak (gram veya miligram) veya hayvan ağırlığı (örneğin, vücut ağırlığının kilogramı başına miligram) başına test maddesi ağırlığı olarak veya sabit diyet konsantrasyonları (yiyecek kilogramı başına miligram veya ppm) şeklinde ifade edilir.
(iv) Ayırt Edici Doz, maddeye bağlı olarak ölüme (insan ölümlerinin içeren) sebep olmadan uygulanabilen, dört sabitlenmiş dozdan en yüksek olanıdır.
(v) Doz miktarı, dozu, dozun sıklığını, dozun uygulanma süresini de kapsayan genel bir terimdir.
(vi) LD_{50} (Ortalama öldürücü doz), Doz uygulanan hayvanların %50' sinin ölümüne sebep olması beklenen, istatistiksel olarak türetilmiş tek bir dozdur. LD_{50} değeri, test hayvanının birim ağırlığı (kilogram başına miligram) başına test maddesinin ağırlığı olarak ifade edilir.
(vii) LC_{50} (Ortalama öldürücü konsantrasyon), maruz kalma esnasında veya sabitlenmiş maruz kalma süresi içinde hayvanların % 50' sinin ölümüne sebep olması beklenen, istatistiksel olarak türetilmiş bir konsantrasyondur. LC_{50} değeri standart hava hacmi (Litre başına miligram) başına test maddesinin ağırlığı olarak ifade edilir.
(viii) NOAEL, Olumsuz Etki Gözlenmeyen Seviye'nin kısaltmasıdır (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL). Uygulama ile ilgili olumsuz bulguların gözlenmediği en yüksek doz veya maruz kalma seviyesidir.
(ix) Tekrarlı doz/subkronik Toksisite, hayat sürelerinin kısa bir bölümünde bir kimyasal maddeye maruz kalan veya bir kimyasal maddenin günlük tekrarlanan dozlarına maruz bırakılan deney hayvanlarında ortaya çıkan olumsuz etkileri kapsar.
(x) İzin Verilebilen En Yüksek Doz (Maximum Tolerated Dose, MTD), kullanıldığı testte, toksisite belirtilerini ortaya çıkarmak için, hayati derecede büyük etkilere yol açmadan uygulanan en yüksek dozdur.
(xi) Deri Tahrişi, test maddesinin uygulanmasını takiben, deride iltihaba bağlı değişikliklerin oluşmasıdır.

(xii) Göz Tahrişi, gözün ön yüzeyine test maddesinin uygulanmasını takiben, gözde meydana gelen değişikliklerdir.
(xiii) Deri hassasiyeti (Alerjik temas deri iltihabı), bağışıklık sistemi vasıtasıyla maddeye karşı deride ortaya çıkan reaksiyonlar.
(xiv) Deri aşınması, test maddesinin 3 dakikadan 4 saate kadar sürebilen deri uygulamalarını takiben, deride ortaya çıkan tersinmez hasarlardır.
(xv) Toksikokinetik, test maddesinin absorpsiyonu, dağılması, metabolizması ve atılması ile ilgili çalışmalardır.
(xvi) Absorpsiyon, uygulanan test maddesinin kan dolaşımına karışmasıdır.
(xvii) Eliminasyon, uygulanan maddenin ve/veya metabolitlerinin vücuttan uzaklaştırılmasıdır.
(xviii) Dağılım, absorplanan test maddesinin ve/veya metabolitlerinin vücut içine nüfuz etmesidir.
(xix) Metabolizma, uygulanan test maddesinin enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla yapısal olarak değişikliğe uğraması işlemleridir.

B.I Akut Tekrarlı Doz/ Subkronik ve Kronik Toksisite
Akut toksik etkiler ve maddenin organ veya sistem üzerindeki toksisitesi, tek bir dozu takiben kullanılan çok çeşitli toksisite testleri (Yöntem B.1 – B.5) ile değerlendirilebilir ve toksik etkinin ön belirtileri elde edilebilir.
Maddenin toksisitesine bağlı olarak limit test veya tam bir LD50 testi düşünülebilir. Ancak solunum çalışmaları için belirlenmiş bir limit test yoktur çünkü tek bir solunum maruz kalması limit değeri henüz bulunmamıştır.
Yöntemlerde hayvan kaybını en aza indirmek için olabildiğince az hayvan kullanılmasına özen gösterilmelidir (Örneğin, sabitlenmiş doz yöntemi (Yöntem B.1 bis) ve akut toksik sınıf (Yöntem B.1 tris) için). Seviye 1 testinde, bir ikinci tür çalışması ilk çalışmadan elde edilen yorumlar için tamamlayıcı olabilir. Bu durumda, standart bir test yöntemi kullanılabilir veya yöntem daha düşük hayvan sayılarına uygun hale getirilebilir.
Tekrarlı doz toksisite testi (Yöntem B.7, B.8 ve B.9) tekrarlanan maruz kalmadan kaynaklanan toksik etkilerin değerlendirilmesini içerir. Mümkün olabildiğince çok bilgi elde edilebilmesi için hayvanların klinik olarak gözlemlenmesi önemlidir. Bu testler, toksik dozların, hedef organlar üzerindeki toksisite etkilerinin açıklığa kavuşturulması hususunda yardımcı olabilir. Uzun dönemli çalışmalarda, bu bakış açılarının daha derinlemesine araştırılması gerekli olabilir (Yöntemler B.26 – B.30 ve B.33).

B.II Mutajenite – Genetik toksisite
Mutajenite, hücreye veya organizmaya ait genetik materyalin yapısı ve miktarında birinden diğerine geçebilen kalıcı değişikliklerin oluşmasıdır. Bu değişiklikler, 'mutasyonlar', tek bir geni, gen bölümlerini, bir gen bloğunu veya tüm kromozomu içerebilir. Tüm kromozomlar üzerindeki etkiler yapısal ve/veya sayısal olabilir.
Temel grup bilgisi için, maddenin mutajenik aktivitesi, bakterideki gen mutasyonları (Yöntem B.13/14) ve memeli hücrelerindeki yapısal kromozom sapmaları (Yöntem B.10) için in vitro çalışmaları ile değerlendirilir.
Kabul edilebilir olanlar, canlı dokuda (in vivo) yürütülen çalışmalardır. Mikroçekirdek testleri (Yöntem B.12) veya kemik iliği hücrelerinin metafaz analizi (Yöntem B.11) gibi yöntemler örnek gösterilebilir. Fakat herhangi aksi bir etki yokluğunda (kontraendikasyon) in vitro yöntemler çok tercih edilir.
Mutajenitenin incelenmesi ve kanser oluşumlarının önceden izlenebilmesi için ek çalışmalar daha yüksek üretim hacimleri ve/veya risk değerlendirilmesi için gereklidir ve bunlar temel gruptan elde edilen sonuçları doğrulamak; temel grupta çalışılmamış uç noktaları incelemek;

canlı doku içerisindeki (in vivo) çalışmaları başlatmak veya devam ettirmek gibi farklı amaçlarla kullanılabilir.
Bu amaçla, yöntem B.15' den B.25' e kadar olan yöntemler, hem in vivo hem de in vitro çalışmaları içerirler hem de biyolojik sınır noktaların genişletilmiş aralığını içerirler. Bu testler, temel grup çalışmalarında kullanılan bakterilerden daha karmaşık organizmalarda diğer uç noktaları ve mutasyonlar üzerinde bilgi sağlar.
Genel ilke olarak, daha ileri mutajenite çalışmaları programı dikkate alındığında, maddenin mutajenite ve/veya kanserojenlik potansiyeli ile ilgili anlamlı ek bilgi sağlayacak şekilde tasarlanmalıdır.
Özgün vakalarda uygun olabilecek fiili çalışmalar, maddenin kimyasal ve fiziksel özelliklerini, ilk bakteriyel sitogenetik analiz sonuçlarını, maddenin metabolik profilini, diğer toksisite çalışmalarının sonuçlarını ve maddenin bilinen kullanım şekillerini de içeren birçok faktöre bağlı olacaktır. Testlerin seçimi için değişmez nitelikte bir program, dikkat gerektiren çeşitli faktörlerin gözlenmesi açısından uygun değildir.
Test stratejileri için bazı genel ilkeler Maddelerin Envanteri, Bildirimi ve Risk Değerlendirmesi Usul ve Esaslarıyla ilgili Yönetmelik tarafından ortaya konulur, fakat risk değerlendirmesi için, açık test stratejileri, yinede esnek ve uygun, özgün duruma göre uyarlanabilen, yönetmelikte bulunabilir.
Daha ileri araştırmalar için yöntemler genetik uç nokta ilkeleri temel alınarak, aşağıdaki şekilde gruplandırılmışlardır:
Gen (nokta) mutasyonlarını incelemek için yapılan çalışmalar
a) Ökaryotik mikroorganizmalar kullanılarak yapılan ileri ve geri mutasyon çalışmaları (*Saccharomyces cerevisiae*) (Yöntem B.15),
b) Memeli hücrelerindeki ileri yöndeki mutasyonu incelemek için in vitro çalışmalar (Yöntem B.17),
c) *Drosophila melanogaster'* deki cinsiyete bağlı çekinik öldürücü analiz, (Yöntem B.2)
d) In vivo somatik hücre mutasyon analizi, fare benek testi, (Yöntem B.24)
Kromozomların normal durumlardan sapmalarını inceleme çalışmaları
a) Memelilerdeki in vivo sitogenetik çalışmalar; ilk değerlendirmede (Yöntem B.11) dahil edilmemişse, kemik iliği hücrelerinin in vivo metafaz analizi dikkate alınmalıdır. Ayrıca, in vivo eşey hücre sitogenetikleri incelenebilir (Yöntem B.23),
b) İlk değerlendirmede dahil edilmemişse, memeli hücrelerindeki in vitro sitogenetik çalışmalar (Yöntem B.10),
c) Kemirgenlerdeki baskın öldürücü çalışmalar (Yöntem B.22),
d) Fare kalıtımsal yer değiştirme testi (Yöntem B.25),
Genotoksik etkiler- DNA üzerindeki etkiler.
Mutajenisite ile ilişkilendirilmeyen ve genetik materyal üzerindeki zararlı etkiler olarak tanımlanan genotoksiklik, doğrudan mutasyon kanıtı olmadan DNA'ya verilmiş zararlar ile belirtilebilir. Ökaryotik mikroorganizmaları ya da memeli hücrelerini kullanan aşağıdaki yöntemler bu tür araştırma için uygun olabilir.

a) Saccharomyces cereviase'da mitotik (mitoz) rekombinasyon
b) DNA hasarı ve tamiri- programlanmamış DNA sentezi, memeli hücreler- in vitro (Yöntem B.18)
c) Memeli hücrelerde kardeş kromatid değişimi-in vitro (Yöntem B.19)

Kanserojenlik potansiyelinin araştırılması için alternatif yöntemler
Hücre kültürlerinde maddenin malignant (kötü huylu tümör) dönüşümü ile ilgili olduğu düşünülen morfolojik ve davranışsal etkiler tetiklemesini ölçebilen ve memeli hücre dönüşüm analizleri mevcuttur (Yöntem B.21). Değişik hücre türleri ve dönüşüm ölçütleri kullanılabilir.
Memelilerde kalıtımsal etkiler için risk değerlendirilmesi

Genlerde oluşan nokta mutasyonlarla oluşan kalıtımsal etkileri, örneğin ilk jenerasyonda eşey hücresinin (germ-cell) mutasyonunu ölçmek için fareye özgü lokus testi (Bu ekte verilmemiştir), ya da kromozomal bozukluklar için (fare kalıtımsal yer değiştirme testi gibi) (Yöntem B.25), ölçebilecek yöntemler mevcuttur. Bu gibi yöntemler, maddenin insan sağlığına olası genetik risklerin tahmininde kullanılabilir ancak bu testlerdeki karmaşıklar açısından bakıldığında ve özellikle özgül lokus testi için çok fazla sayıda hayvana ihtiyaç olduğu, göz önüne alınırsa testler yürütülmeden önce güçlü bir doğrulamaya ihtiyaç vardır.

B III .Kanserojenite

Kimyasallar, tahmin edilen etki mekanizmasına göre genotoksik ve genotoksik olmayan kanserojenler olarak sınıflandırılabilir.

Maddenin genotoksik potansiyeli hakkındaki ön tarama bilgileri mutajeniklik/ genotoksiklik çalışmalarında elde edilebilir. İlave bilgiler tekrarlı doz, subkronik yada kronik toksisite testlerinden elde edilebilir. Tekrarlı doz toksisite testleri, Yöntem B.7 ve daha uzun tekrarlı doz çalışmaları, tekrarlı doz testlerinde gözlenen histopatolojik değişiklerini ilgili dokularda hiperplazya gibi, değerlendirilmesini içerir. Bu çalışmalar ve toksikokinetik çalışmalar, bu özelliklerinin belirlenmesi için daha ileri araştırmaya ihtiyaç duyan kanserojenik potansiyeldeki kimyasalların kanserojenlik testinde (Yöntem B.32) ya da bileşik kronik toksisite/kanserojenite (Yöntem B.33) testinde tanımlanmasına yardım edebilir.

B IV.Üreme sistemine toksisite

Üreme sistemine toksisite, 'doğurganlık üzerine etki' olarak tanımlanan, dişi ya da erkeğin üreme işlevlerinin azalması yada normal embriyonik gelişimde ve emzirme dönemini de içeren ve 'gelişimsel toksisite' olarak tanımlanan veya, döller üzerinde kalıtımsal olmayan zararlı etkilerin tetiklenmesi gibi farklı yollarla belirlenebilir.

Gelişimsel toksisite testinin bir parçası olarak normal embriyonik gelişim çalışmaları için test yöntemi (Yöntem B.31) birincil olarak oral (ağız) yoldan alım ile uygulanır. Alternatif olarak test maddesinin fiziksel özelliklerine bağlı olarak, diğer yollar da kullanılabilir. Böyle hallerde test yöntemi 28 günlük test yönteminin uygun elemanlarını dikkate alarak uygun bir şekilde adapte edilmelidir.

Üçüncü jenerasyon üreme testi gerektiğinde, iki jenerasyon üreme testi için açıklanan yöntem (Yöntem B.35), üçüncü jenerasyonu kapsayacak şekilde genişletilebilir.

B.V. Nörotoksisite

Nörotoksisite, merkezi ya da çevresel sinir sisteminde yapısal ya da biyokimyasal değişiklikler ya da fonksiyonel değişimler gibi farklı yollarla belirlenebilir. Nörotoksisitenin birincil işareti akut toksisite testlerinden elde edilebilir.

Tekrarlı doz toksisite testi, Yöntem B.7, nörotoksikolojik etkilerin değerlendirilmesini içerir ve mümkün olan en fazla bilgiyi elde edebilmek için hayvanlar hakkındaki klinik gözlemlere önem verilir. Yöntem, bu özelliğin daha derinlemesine araştırılmasına ihtiyaç duyan nörotoksik potansiyeldeki hayvanları tanımlamaya yardım etmelidir. Ek olarak, diğer toksisite çalışmalarında belirlenemeyen maddelerin özgül toksisite potansiyellerini de dikkate almak önemlidir. Örneğin bazı fosforlu organik bileşiklerin geciktirilmiş nörotoksisiteye neden olduğu gözlenmiştir ve bunlar test yöntemi B.37 ve B.38'de tekli yada çoklu dozlara maruz kalma izlenerek belirlenebilir.

B.VI. İmmüntoksisite (Bağışıklık toksisitesi)

İmmüntoksisite, immünbaskılama ve/veya aşırı duyarlılık ya da uyarılmış kendiliğinden immünite ile sonuçlanan immün sistem cevaplarının güçlendirilmesi gibi farklı yollarla belirlenebilir. Tekrarlı doz toksisite testi, Yöntem B7, immunotoksik etkilerin değerlendirilmesini içerir. Yöntem immüntoksik potansiyeldeki ve bu özelliklerinin belirlenmesi için daha derinlemesine testler gereken kimyasalları tanımlamakta yardımcı olacaktır.

B.VII Toksikokinetik

Toksikokinetik çalışmalar, toksisite verilerinin yorumlanması ve değerlendirilmesine yardımcı olur. Bu çalışmalar, test edilen kimyasalın toksisitesine ilişkin özel durumlarını açıklamak amacıyla geliştirilmiştir ve sonuçlar ileri toksisite testlerinin tasarımına yardımcı olur. Bütün değişkenlerin tüm hallerde belirlenmesi öngörülmemiştir. Sadece nadir durumlarda toksikokinetik çalışmaların tüm aşamaları gerekli olabilir (emilim, atılım, dağılım ve metabolizma). Belli bileşikler için, bu dizilimdeki değişiklikler önerilebilir yada tek doz çalışması yeterli olabilir.(Yöntem B.36).

Kimyasal yapı(SAR) hakkında bilgi ya da fizikokimyasal özellikler, istenilen uygulama yolu ve metabolik ve dokusal dağılım olasılıkları aracılığıyla, absorbsiyon (emilim) karakteristikleri hakkında bir belirti sağlayabilir. Ayrıca daha önceki toksisite ve toksisokinetik çalışmalarda toksikokinetik parametreler bulunabilir.

C.HAYVAN BAKIMI

Çevresel koşulların sıkı kontrolü ve uygun havyan bakım teknikleri toksisite testi için önemlidir.

(i) Barınma koşulları

Deney hayvanı odalarındaki çevresel koşullar ya da duvarlar test türlerine uygun olmalıdır. Sıçanlar, fareler ve gine domuzu (guinepig) için uygun koşullar, %30 ila %70 bağıl nemde 22°C ±3°C dir. Tavşanlar için sıcaklık %30 ila %70 bağıl nemde 20°C ±3°C olmalıdır.

Bazı deneysel teknikler sıcaklık etkilerine özel olarak duyarlıdır ve bu hallerde uygun koşulların ayrıntıları, test yönteminin açıklamasında verilir. Tüm toksik etki araştırmalarında, sıcaklık ve nem izlenmeli, kaydedilmeli ve çalışmanın son raporunda verilmelidir.

Işıklandırma yapay olmalıdır ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak sırada olmalıdır. Işıklandırma şablonu çalışmanın son raporunda belirtilmelidir.

Test yönteminde aksi belirtilmedikçe, hayvanlar ayrı ayrı barındırılmalı ya da küçük aynı cinsiyetten gruplar halinde kafeslenmelidir ve bu hallerde kafes başına hayvan sayısı beş'i geçmemelidir.

Hayvan deneylerinin raporunda, kullanılan kafesin cinsini ve maruz kalma sırasında ve sonrasında gözlem evresinde her bir kafesteki hayvan sayısını belirtmek önemlidir.

(ii) Besleme koşulları

Beslenme programı, test edilen türlerin besin gereksinmelerini karşılayacak özellikte olmalıdır. Test maddeleri hayvanların besinleri ile veriliyorsa, besin,test maddesi ve besin bileşenleri arasındaki etkileşim nedeniyle azalabilir. Bu tür bir tepkimenin olabilirliği testin sonuçları yorumlanırken göz önüne alınmalıdır. Yerleşik laboratuvar beslenme rejimleri, sınırsız su kaynağı ile birlikte kullanılmalıdır. Beslenme rejiminin seçimi bu metot aracılığı ile verildiğinde, uygun karışmayı sağlama gereksiniminden etkilenebilir.

Toksisiteyi etkileyen besin kirleticileri birbirini etkileyen konsantrasyonlarda bulunmamalıdır.

Ç. ALTERNATİF TESTLER

Ülkemizin bilimsel hedeflerinden biri, mevcut hayvan testleri, daha az hayvan kullanılan, daha az acıya yol açan veya hayvanların tümünün kullanılmasından kaçınılan, mevcut hayvan testlerindeki bilgilerle aynı seviyede bilgi sağlayan alternatif tekniklerin geliştirilmesi ve geçerliliklerini sağlamaktır.

Bu tür yöntemler, elde edilebilir olduğunda, zarar belirlemesi ve gerçek(iç) zararlar için sınıflandırılması ve etiketlenmesi için değerlendirilmelidir.

D.DEĞERLENDİRME VE YORUM

Testler değerlendirildiklerinde ve yorumlandıklarında, hayvanlarda veya in vitro olarak yapılan çalışmaların sonuçlarının doğrudan insana uyarlanmasındaki sınırlamalar göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple insanlardaki olumsuz etkilerine dair kanıt varsa, test sonuçlarının doğrulanmasında kullanılabilir.

E. KAYNAKLAR

Bu yöntemlerin pek çoğu OECD Test Dokümanı Programı çerçevesinde geliştirilmiştir ve karşılıklı kabul edilebilir veri sağlayabilmek için İyi Laboratuvar Uygulamaları ilkelerine göre uygulanmalıdır.

İlave bilgiler OECD rehber dokümanından ve başka diğer kaynaklardan temin edilebilir.

B.1 bis AKUT ORAL TOKSİSİTE- SABİTLENMİŞ DOZ İŞLEMİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 420 (2001) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Geleneksel yöntemler, akut toksisite değerlendirilmesinde hayvan ölümlerini en son nokta olarak kullanır. 1984'te akut toksisite testleriyle ilgili seri olarak sabit doz uygulamasına dayanan yeni bir yaklaşım İngiliz Toksikoloji Derneği tarafından önerilmiştir(1). Yaklaşımda, hayvan ölümlerinin en son nokta olarak kullanımından kaçınılmıştır ve bunun yerine sabitlenmiş doz serilerinden, birinde gözlenen toksisite belirtilerine dayandırılmıştır. İngiltere (UK) (2) ve uluslararası (3) in vivo validasyon çalışmalarını takiben işlem 1992 yılında test yöntemi haline getirilmiştir. Bunu takiben, Sabitlenmiş Doz İşleminin istatiksel özellikleri, matematiksel modellerin kullanıldığı bir dizi çalışmayla değerlendirilmektedir (4)(5)(6). Diğer geleneksel yöntemlere kıyasla, prosedürün tekrarlanabilir olduğunu, daha az hayvan kullanıldığı ve daha az hayvanın kurban edilmesine sebep olduğu gösterilen, in vivo ve modelleme çalışmaları beraberce maddeleri, diğer toksisite test yöntemleri ile benzer şekilde sınıflandırabilmektedir.

Belirtilen bir amaç için en uygun test yöntemi Akut Oral toksisite Testi Kılavuz Dokümanlarına (7) bakılararak bulunabilir. Bu Doküman ayrıca B.1bis'teki Test Yöntemlerinin yürütülmesi ve yorumlanmalarına ilişkin ilave bilgiler de içermektedir.

Asıl çalışmada sadece orta derecede toksik dozların kullanılması test yönteminin temelini oluşturur ve öldürücü olması beklenen dozların uygulanmasından kaçınılmalıdır. Ayrıca, aşındırıcı ve ciddi tahriş edici etkiye bağlı olarak acı ve ağrı verdiği bilinen maddelerin uygulanmasına gerek yoktur. Ölmek üzere olan veya açıkça acı çeken veya bunun ciddi belirtilerini gösteren hayvanlar insani şekilde öldürülebilir ve bunlar test sonuçlarının yorumlanmasında dikkate alınarak, testte ölen hayvanlarla aynı şekilde değerlendirilir. Ölmek üzere olan veya ciddi anlamda acı çeken hayvanların öldürülmesine karar verme kriterleri ve beklenen veya yaklaşan ölümlerin teşhis edilmesi ile ilgili yönlendirme, ayrı bir kılavuz dokümanın konusudur (8).

Yöntem, zararlı özellikler hakkında bilgi verir ve maddenin akut toksisiteye neden olan kimyasalların sınıflandırılmasını sağlayan Küresel Uyumlaştırılmış Sistem'e (Globally Harmonised System, GHS) göre sınıflandırılmasına olanak sağlar (9).

Test uygulama laboratuvarı çalışmaya başlamadan önce, test maddesiyle ilgili ulaşılabilecek tüm bilgiyi göz önünde bulundurmalıdır. Böyle bir bilgi, maddenin kimyasal yapısını, kimliğini, fizikokimyasal özelliklerini, maddeyle ilgili önceden yapılmış in vitro veya in vivo toksisite testlerini, yapısal olarak ilişkili maddelere ait toksikolojik verileri ve maddenin istenmeyen kullanımını/kullanımlarını kapsayacaktır. Bu bilgi, testin insan sağlığını korumak için uygulandığı ve uygun başlangıç dozunun seçilmesine yardımcı olacağını konusunda tatmin olmak için gereklidir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Akut oral toksisite: Bir maddenin ağız yoluyla 24 saat içinde tek veya çoklu dozlar halinde verildiğinde ortaya çıkan olumsuz etkilerine işaret eder.

Gecikmiş ölüm: Hayvan 48 saat içinde ölmez veya ölmeye yakınmış gibi görünmez fakat 14-günlük gözlem süresinden sonra ölürse, gecikmiş ölüm anlamına gelir.

Doz:Uygulanan test maddesinin miktarıdır. Doz, test hayvanının birim ağırlığı başına düşen test maddesinin ağırlığı (örneğin, mg/kg) olarak ifade edilir.

Belirgin toksisite: Test maddesinin uygulanmasından sonra görülen açık toksisite belirtileri için (örnekler için bakınız (3)) kullanılan genel terimdir, öyle ki en yüksek sabitlenmiş dozda çoğu hayvanda ya ciddi ağrı ve devam eden ciddi acı çekme belirtileri, ölmeye yakın olma durumu (kriterler İnsancıl Sınır Noktalar Kılavuzunda (Humane Endpoints Guidance) sunulmuştur (8)), ya da olası ölüm beklenebilir.

GHS (Globally Harmonised System): Kimyasal Maddeler ve Karışımlar için Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi OECD'nin (insan sağlığı ve çevre), BM Tehlikeli Malların Taşınmasıyla ilgili Uzman Komitesi (fiziko-kimyasal özellikler) ve ILO (zarar iletişimi) ve Kimyasalların Güvenli İdaresi için Kuruluşlararası Programı (IOMC) ile birlikte yürüttüğü birleştirilmiş müşterek bir aktivitedir.

Yaklaşan ölüm: Planlanan bir sonraki gözlem zamanından önce beklenen ölüm veya ölüme yakın durum. Bu durumun kemirgenlerdeki belirtileri arasında çırpınma, yanal pozisyon sırt üstü yatma ve titreme vardır (Daha fazla ayrıntı için İnsancıl Sınır Noktalar Dokümanına (Humane Endpoints Guidance) bakınız(8)).

LD_{50} (ortalama öldürücü doz): Oral yolla uygulandığında hayvanların %50'sinin ölümüne neden olması beklenen, maddenin istatiksel olarak türetilen tek dozu. LD_{50} değeri test hayvanının birim ağırlığı başına düşen test maddesinin ağırlığı olarak ifade edilir (mg/kg).

Sınır doz: Test uygulamalarında en üst sınırdaki doza (2000 veya 5000 mg/kg) karşılık gelir.

Ölmek üzere olma (Moribund) durumu: Ölme durumunda olma veya tedavi edilse de yaşama kabiliyetinin olmaması durumu (Daha fazla ayrıntı için İnsancıl Sınır Noktalar Dokümanına (Humane Endpoints Guidance) bakınız(8)).

Tahmini ölüm: Deneyin planlanan sonlandırma zamanından önceki, gelecekte bilinen bir zamanda ölüme dair klinik belirtilerin mevcut olması, örneğin: yiyecek ve su alamama durumu (Daha fazla detay İnsancıl Sonlanma Noktaları Dokümanına (Humane Endpoints Guidance)bakınız (8)).

1.3. Test yönteminin ilkesi

Tek bir cinsiyetten oluşan hayvan gruplarına işlem, adım adım izlenerek 5, 50, 300 ve 2000 mg/kg sabitlenmiş dozlar kullanılarak (istisnai olarak 5000 mg/kg'lık ilave bir sabit doz düşünülebilir, bakınız bölüm 1.6.2) doz uygulanır. Başlagıç dozu seviyesi, dozun ciddi toksik etkilere ve ölüme neden olmadan bazı toksisite belirtileri oluşturması beklendiğinden, gözlem çalışmasına göre seçilir. Klinik belirtiler ve ağrı, acı ve olması yakın ölümle ilgili koşullar

ayrı bir OECD Yönergesinde (8) detaylı olarak tanımlanır. Sonraki gruplara, toksisite belirtileri veya ölümün görülüp görülmediğine bağlı olarak, daha yüksek veya daha düşük dozlar uygulanabilir. Bu işlem doz belirgin toksik etkiye neden oluncaya kadar veya ilk ölüm görülünceye kadar veya en yüksek dozda hiçbir etki görülmediği sürece veya en düşük dozda ölüm meydana gelinceye kadar devam eder.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hayvan türlerinin seçimi

Tercih edilen kemirgen türü sıçandır, ancak diğer kemirgen türleri de kullanılabilir. Normalde dişiler kullanılır (7). Geleneksel LD_{50} testleriyle ilgili literatürler, cinsiyetler arasında duyarlılıkları bakımından çok az farklılık olduğunu göstermiştir fakat farklılıkların gözlendiği durumlarda dişiler çok az da olsa daha duyarlıdırlar (10). Ancak, eğer yapısal olarak ilgili kimyasalların toksik ve toksikokinetik özelliklerine ait bilgiler, erkeklerin dişilerden daha duyarlı olduğunu gösterirse, böyle durumlarda erkekler kullanılmalıdır. Çalışma erkeklerle yürütülürse, gerekçe gösterilmelidir.

Yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşlarının genç, yetişkin ve sağlıklı olanları kullanılmalıdır. Dişilerin doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Doz uygulamasının başlangıcında her bir hayvan 8-12 haftalık arasında olmalı ve ağırlıklar, daha önceden doz verilen hayvanların ortalama ağırlıklarının ± 20 %'sini geçmemelidir.

1.4.2. Barınma ve besleme koşulları

Deney hayvanları için oda sıcaklığı 22°C (± 3°C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranının en az %30 olması ve tercihen %70'i geçmemesi gerekmesine rağmen, odanın temizlenmesi sırası dışında, nem olarak hedef % 50-60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır. Beslenme için sınırsız içme suyu tüketimiyle beraber geleneksel laboratuvar yiyecekleri kullanılabilir. Hayvanlar dozlara göre gruplandırılıp kafeslere konabilirler ancak kafes başına düşen hayvan sayısı hayvanların net bir şekilde gözlenebilmesini etkilememelidir.

1.4.3. Hayvanların hazırlanması

Hayvanlar rastgele seçilirler, ayrı ayrı kimliklendirilmeleri için işaretlenirler ve deneyden en az beş gün öncesinden itibaren, deneysel barınma ve besleme koşullarında laboratuar ortamına alışmaları için, deney kafeslerinde muhafaza edilirler

1.4.4. Dozların hazırlanması

Test maddeleri genellikle sabit hacimde, test edilecek doz aralığında yer alan çeşitli konsantrasyonlardaki dozlarda uygulanmalıdır. Sıvı bir son ürün veya karışım test edilirken, seyreltilmemiş test maddesinin kullanılması ör. sabit bir konsantrasyon, sonrasında o maddenin risk değerlendirmesiyle daha ilgili olabilir ve bu bazı düzenleyici yetkili makamların ortaya koyduğu bir gerekliliktir. Her durumda da uygulama için maksimum doz hacmi aşılmamalıdır. Sıvının tek seferde uygulanabilecek maksimum sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Kemirgenlerde hacim normalde 1ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir ancak sulu çözeltilerde 2ml/100g vücut ağırlığı düşünülebilir. Uygun olan her yerde dozun hazırlanma formülasyonuna bağlı olarak sulu çözeltinin/ süspansiyonun/

emülsiyonun kullanılması tavsiye edilir, bunu tercih edilme sırasına göre yağda (örneğin, mısır yağı) çözeltinin/süspansiyonun/emülsiyonun kullanımı ve diğer taşıyıcılardaki mümkün çözelti kullanımı izler. Su dışındaki taşıyıcıların toksik özellikleri bilinmelidir. Kullanılacağı süre boyunca, kararlılığı bilinmedikçe ve kabul edilebilir olmadıkça, dozlar, uygulamadan kısa bir süre önce hazırlanmalıdır.

1.5. İşlem

1.5.1. Dozların uygulanması

Test maddesi tek doz olarak gavaj yöntemi kullanılarak sonda ile veya uygun bir boşaltım tüpü kullanılarak uygulanır. Tek dozun mümkün olmadığı olağandışı durumlarda, daha küçük parçalar halinde, 24 saati geçmeyen aralıklarla verilmelidir. Hayvanlar doz uygulanmadan önce aç bırakılmalıdır (ör. sıçanda, gece boyunca su verilebilir fakat yiyecek verilmemelidir; farede de, 3-4 saat için su verilebilir fakat yiyecek verilmemelidir). Aç bırakılma süresini takiben hayvanlar tartılmalı ve test maddesi uygulanmalıdır. Madde uygulandıktan sonra, sıçanlara 3-4 saat, farelere 1-2 saat yiyecek verilmeyebilir. Doz, bir sürenin üzerinde parça parça uygulandığında bu sürenin uzunluğuna bağlı olarak hayvanlara yiyecek ve su sağlanması gerekebilir.

1.5.2. Gözlem çalışması

Gözlem çalışmasının amacı asıl çalışma için uygun başlangıç dozlarının seçilmesidir. Test maddesi hayvanlara sıralı şekilde Ek-I'deki akış şeması izlenerek uygulanır. Gözlem çalışması, asıl çalışma için başlangıç dozuna karar verildikten sonra (veya en düşük sabit dozda ölüm görüldüğünde) bitirilir.

Gözlem çalışması için başlangıç dozu 5, 50, 300 ve 2000 mg/ kg'lık sabit doz seviyeleri arasından, aynı kimyasal ve yapısal olarak ilişkili kimyasalların in vivo(canlı dokularda) veinvitro(yapay bir ortamdaki) çalışmalardan elde edilen verilere dayanan belirgin toksik etki oluşturması beklenen doz olarak seçilir. Böyle bir bilginin olmadığı durumda başlangıç dozu 300 mg/kg olacaktır.

Her hayvana doz uygulamaları arasında en az 24 saatlik bir süre ara verilmelidir. Bütün hayvanlar en az 14 gün gözlenmelidir.

İstisnai olarak ve sadece özel düzenleyici gerekliliklerle mazur gösterildiği zaman, 5000 mg/kg'lık ilave daha yüksek sabit doz düzeyininin kullanılması düşünülebilir (bakınız Ek-III). Hayvan refahıyla ilgili kaygılar nedeniyle hayvanları GHS Kategori 5 aralığında (2000-5000 mg/kg) teste tabi tutmak uygun bulunmamıştır ve sadece böyle bir testin sonuçlarının hayvan ve insan sağlığını ve çevreyi korumakla doğrudan ilintili olduğuna dair kuvvetli bir olasılık varsa kullanımı düşünülmelidir

Gözlem çalışmasında en düşük sabit doz ile (5mg/kg) test edilen bir hayvanın öldüğü durumlarda, normal işlem çalışmayı bitirmek ve maddeyi GSH Kategori 1'e koymaktır (Ek-I'de gösteridiği gibi). Ne var ki, eğer sınıflandırma için daha fazla onay gerekirse, akabinde zorunlu olmayan tamamlayıcı bir prosedür yürütülebilir. İkinci bir hayvana 5mg/kg doz uygulanır. Eğer ikinci hayvan ölürse, sonrasında GHS Kategori 1 onaylanacak ve çalışmaya hemen son verilecektir. Eğer ikinci hayvan yaşarsa, en fazla üç ilave hayvana 5mg/kg'lık doz uygulanacaktır. Çünkü yüksek riskte ölüm söz konusu olacağından bu hayvanlara hayvan

refahının korunması açısından sıralı şekilde doz uygulanmalıdır. Her hayvanın doz uygulamaları arasındaki zaman aralığı, bir önceki hayvanın sağ kalmasını sağlayacak yeterlilikte olmalıdır. İkinci bir ölüm görülürse, doz dizisine hemen son verilmeli ve daha fazla hayvana doz uygulanmamalıdır. Çünkü ikinci ölümün görülmesi (sonlandırmada test edilen hayvanların sayısından bağımsız) sonuç A'ya karşılık gelir (2 veya daha fazla ölüm), Ek-II'deki 5mg/kg sabit dozda sınıflandırma kuralı (eğer 2 veya daha fazla ölüm varsa Kategori 1; 1'den fazla ölüm yoksa Kategori 2'dir) takip edilir. İlaveten, Ek-IV, yeni GHS tamamlanıncaya kadar Avrupa Birliği (AB) sistemindeki sınıflandırma hakkında rehberi içerir.

1.5.3. Asıl çalışma

1.5.3.1. Hayvan sayıları ve doz seviyeleri

Başlangıç dozu test uygulanmasını takiben yapılacaklar,Ek-II'deki akış şemasında gösterilmiştir. Testi durdurmak ve uygun tehlike sınıfına yerleştirmek ya da daha yüksek bir sabit dozda veya daha düşük bir sabit dozda test etmek şeklindeki üç faaliyetten birini yapmak gerekecektir. Ancak, hayvanları korumak için gözlem çalışmasında ölüme neden olan doz asıl çalışmada tekrar uygulanmaz (bakınız Ek-II). Tecrübeler göstermiştir ki başlangıç dozundaki en olası sonuç, maddenin sınıflandırılabileceği ve ilave testlere ihtiyaç duyulmayacağıdır.

Araştırılacak her bir doz için normalde tek cinsiyetten beş hayvan kullanılacaktır. Bu beş hayvan, biri gözlem çalışmasında seçilen dozun uygulandığı hayvan olmak üzere ilave dört hayvandan oluşturulur (olağandışı olarak, asıl çalışmada kullanılan bir dozun gözlem çalışmasında yer almadığı durumlar haricinde).

Her seviyedeki doz uygulamaları arasındaki zaman aralığı toksik etki belirtilerinin başlangıcı, süresi ve ciddiyeti göz önüne alınarak belirlenir. Önceden doz uygulanan bir hayvanın sağ kaldığından emin olununcaya kadar hayvanların bir sonraki dozla muamele edilmeleri ertelenmelidir. Eğer gerekirse, gecikmiş toksik etki gözlenmesine olanak sağlamak için, her bir dozda, doz uygulamaları arasında 3–4 gün süre olması tavsiye edilir. Zaman aralığı, örneğin bir sonuca varılamayan cevapların olduğu durumlarda, uygun şekilde ayarlanabilir. Üst sabit doz olarak 5000 mg/kg'ın kullanılması düşünüldüğünde, Ek-III'te belirtilen süreç takip edilmelidir. (ayrıca bakınız bölüm 1.6.2).

1.5.3.2. Sınır testi

Sınır testi öncelikle deneyi yapan kişinin, test maddesinin toksik olmadığını gösteren bilgilere sahip olduğu ör. Sadece düzenleyici sınır dozlarının üzerinde toksik etki olduğuna dair, bilgiye sahip olduğu durumlarda yapılır. Test maddesinin toksisitesi ile ilgili bilgi test edilen benzer bileşikler veya benzer karışımlar veya ürünler hakkındaki bilgilerden, toksikolojik bakımından önemi olan bileşenin yüzdesi ve tanımı dikkate alınarak elde edilir. Toksisiteyle ilgili herhangi bir bilginin olmadığı veya test maddesinin toksik olmasının beklendiği durumlarda asıl test yapılmalıdır.

Normal süreç kullanılarak, 2000 mg/kg (veya istisnai olarak 5000 mg/ kg) gözlem çalışması başlangıç dozunu takiben ilave dört hayvana bu seviyede doz uygulanması bu doküman için bir sınır testidir.

1.6. Gözlemler

Hayvanlar doz uygulandıktan sonra ilk 30 dakika boyunca en az bir defa, ilk 4 saatte daha dikkatlice olmak üzere ilk 24 saat içinde düzenli olarak ve bundan sonra 14 gün boyunca her gün bireysel olarak gözlemlenir. Hayvanlar, çalışmadan çıkartılmaları ve insancıl olarak öldürülmeleri gerektiğinde veya ölü bulundukları zaman bu uygulamaya devam edilmez. Ancak gözlem süreleri asla değişmeyecek şekilde sabit olmamalıdır. Bu süre toksik reaksiyonlarla, bu reaksiyonların başlangıç zamanlarıyla ve iyileşme süresinin uzunluğuyla belirlenmelidir, bu yüzden de gerekli olduğu düşünüldüğünde bu süre uzatılabilmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlarla, ölüm zamanları ve özellikle de ölümlerin geç gerçekleşmesi eğilimi varsa önemlidir (11). Her bir hayvan için ayrı ayrı elde edilen verilerle birlikte tüm gözlemler sistematik olarak kaydedilmelidir.

Eğer hayvanlar toksisite belirtileri göstermeye devam ederse ilave gözlemler yapılması gerekecektir. Gözlemler ciltteki, kürkteki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki değişikliklerle, solunum, dolaşım, otonomik ve merkezi sinir sistemindeki, somatomotor aktivite ve davranış değişikliklerini kapsamalıdır. Titreme, çırpınma, tükürük salgılanması, ishal, uyuşukluk, uyku ve koma ile ilgili gözlemlere özellikle dikkat edilmelidir. İnsancıl Sonlanma noktaları Dokümanında özetlenen (8) ilkeler ve kriterler dikkate alınmalıdır. Ölmek üzere olan, acı ve ağrı çeken hayvanlar insani şekilde öldürülmelidir. Hayvanlar insani nedenlerle öldürüldüğünde veya ölü bulunduklarında ölüm zamanları olabildiğince hassas şekilde kaydedilmelidir.

1.6.1. Vücut ağırlığı

Bütün hayvanların ağırlıkları ayrı ayrı, madde uygulanmadan kısa bir süre önce ve sonrasında da en azından haftalık olarak tayin edilmelidir. Ağırlık değişiklikleri hesaplanmalı ve kaydedilmelidir. Test sonunda sağ kalan hayvanlar da tartılır ve insani şekilde öldürülürler.

1.6.2. Patoloji

Tüm test hayvanlarına (test sırasında ölenler veya hayvan refahı nedeniyle testten uzaklaştırılan hayvanlarda dâhildir) tam teşekküllü otopsi yapılmalıdır. Her bir hayvan için bütün büyük çaplı patolojik değişiklikler kaydedilmelidir. İlk dozun uygulanmasından sonra 24 saat ya da daha fazla sağ kalan hayvanlarda, organların mikroskobik incelemeleri büyük çapta patoloji kanıtı gösteriyorsa, bu incelemeler yararlı bilgiler sunabilirler.

2. VERİLER

Veriler her bir hayvan için ayrı ayrı sağlanmalıdır. Ayrıca, veriler, her bir test grubu için kullanılan hayvan sayısını, toksisite belirtileri gösteren hayvanların sayısını, test sırasında ölü bulunan veya insani nedenlerle öldürülen hayvan sayısını, hayvanlar için ayrı ayrı ölüm zamanlarını, toksik etkilerin tanımı, tersinir olup olmadığı ve otopsi bulgularını gösterecek şekilde tablo halinde özetlenmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test maddesi:
- fiziksel özelliği, saflığı ve ilgiliyse fizikokimyasal özellikleri (izomerizasyon dahil)
- CAS numarasını içeren tanımlama bilgileri.

Taşıyıcı, (eğer uygunsa):
- sudan farklıysa taşıyıcı seçimi için gerekçe.

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk,
- biliniyorsa, hayvanın mikrobiyolojik durumu;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti (gerekirse, dişilerin yerine erkek hayvanların kullanılma gerekçeleri de olmalıdır);
- hayvanların kaynakları, barınma koşulları, diyet, vs.

Test koşulları:
- uygulanan maddenin fiziksel hali de dahil test maddesinin formülasyonuyla ilgili detaylar;
- dozun uygulandığı hacim ve doz uygulama zamanı dahil test maddesinin uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- yiyecek ve su kalitesiyle ilgili detaylar (diyet türü/kaynağı, su kaynağı dahil);
- başlangıç dozunun seçimi için gerekçe.

Sonuçlar:
- tepki verilerinin ve doz seviyelerinin her bir hayvan için çizelgesi (ör. Etkilerin doğası, şiddeti ve uzunluğu ve ölüm dahil toksisite belirtileri gösteren hayvanlar);
- vücut ağırlığı ve vücut ağırlığı değişikliklerinin çizelgesi;
- dozun uygulandığı gün, sonrasında haftalık aralıklarla ve ölümdeki veya yaşamlarını sonlandırma durumlarındaki her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı;
- planlanan gözden çıkarılmalardan önce gerçekleşen ölümlerin tarihi ve zamanı;
- toksisite belirtilerinin başlangıç zamanı ve bu belirtilerin her bir hayvan için tersinir olup olmadığı,
- mevcutsa, her bir hayvan için otopsi bulguları ve histopatolojik bulgular

Sonuçların tartışılması ve yorumlanması

Yorumlar.

4. KAYNAKLAR

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183 -196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

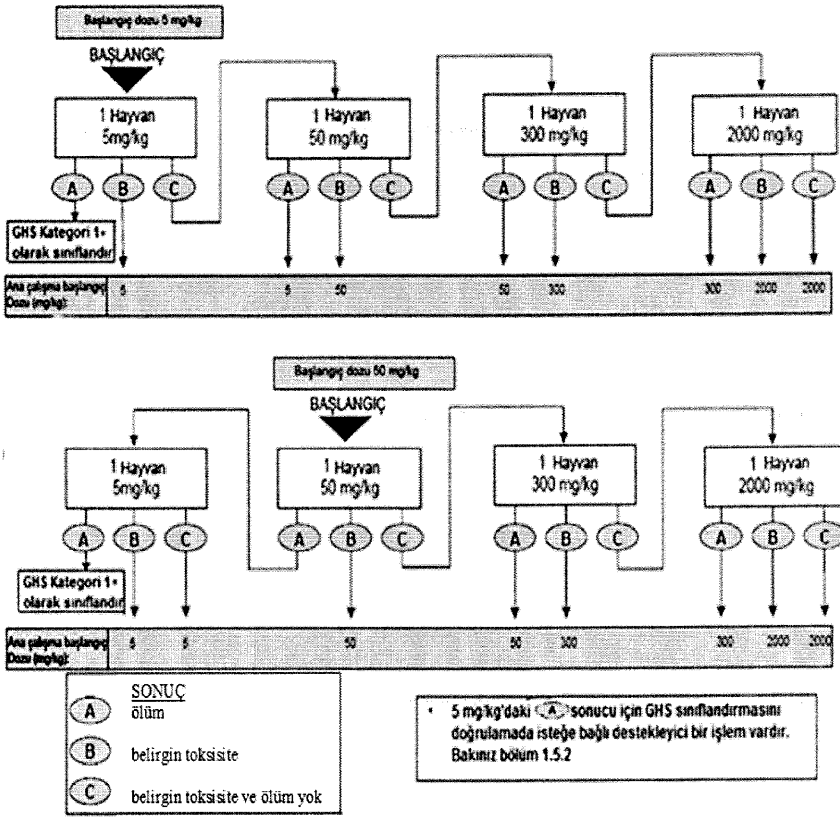
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,ENdocuments-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation . In: Principles and Methods of Toxicology . 3 rd Edition. A.W. Hayes , Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

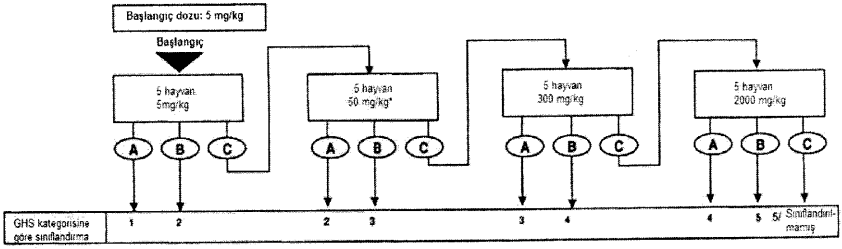
Ek-I

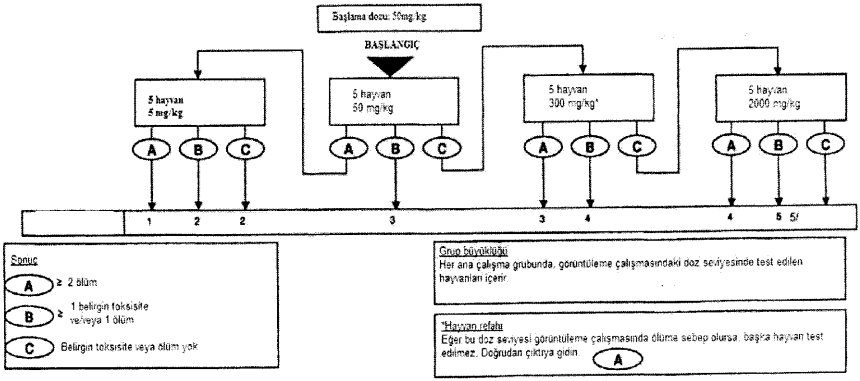
Gözlem Çalışması İçin Akış Şeması

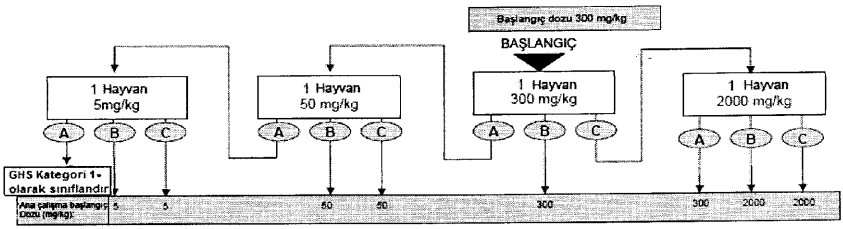


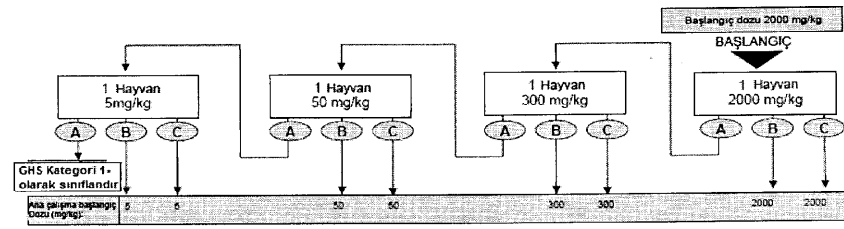
Ek-II

Ana Çalışma İçin Akış Şeması











* 5 mg/kg'daki (A) sonucu için GHS sınıflandırmasını doğrulamada isteğe bağlı destekleyici bir işlem vardır. Bakınız bölüm 1.5.2

Ek-III

Beklenen LD_{50} Değerleri 2000 mg/kg'ın Üzerinde Olan Test Maddelerinin Test Edilmelerine Gerek Olmadan Sınıflandırılma Kriterleri

Zararlılık ölçütü Kategori 5'e göre düşük akut toksisite zararı olan fakat belli koşullarda zayıf popülasyonlar üzerinde tehlikeli olabilecek test maddelerinin tanımlanmasını olanaklı kılmayı amaçlamaktadır. Bu maddelerin oral veya dermal LD_{50} değerlerinin 2000–5000 mg/kg arasında olması beklenir. Diğer yollar için de bu değerler eşdeğer dozlardır. Test maddeleri 2000 mg/kg < LD_{50}< 5000 mg/kg olarak tanımlanan tehlike kategorisinde (GHS, Kategori 5) aşağıdaki durumlar söz konusu olduğunda sınıflandırılabilirler:

a) ölüm görülme sıklığına dayanarak, Ek-II'nin herhangi bir test uygulama planına göre bu kategoriye yönlendirilmişse,

b) daha önceden mevcut olan güvenilir kanıtlara göre LD_{50} değeri Kategori 5 değerlerinin aralığı içindeyse veya insanlardaki diğer hayvan çalışmaları veya toksik etkileri insan sağlığıyla ilgili kaygılara işaret ediyorsa,

c) verilerin ekstrapolasyonu, tahmini ve ölçülmesi sırasınca daha zararlı bir sınıfa geçişe izin verilmiyorsa ve

- insanda anlamlı toksik etkilerin gözlendiğine işaret eden güvenilir bilgi mevcutsa veya
- Kategori 4 değerlerine kadar test uygulandığında, oral (ağız yoluyla) yolla herhangi bir ölüm gözlenirse veya
- Kategori 4 değerlerine kadar test uygulandığında, uzman değerlendirmesinin anlamlı toksisite belirtilerini, ishal, piloereksiyon veya dağınık, tımarlanmamış görünüm haricinde, teyit ettiği durumlarda veya
- uzman değerlendirmesinin diğer hayvan çalışmalarından elde edilen anlamlı akut etki potansiyeline işaret eden güvenilir bilgiyi teyit ettiği durumlarda.

2000 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda testin uygulanması

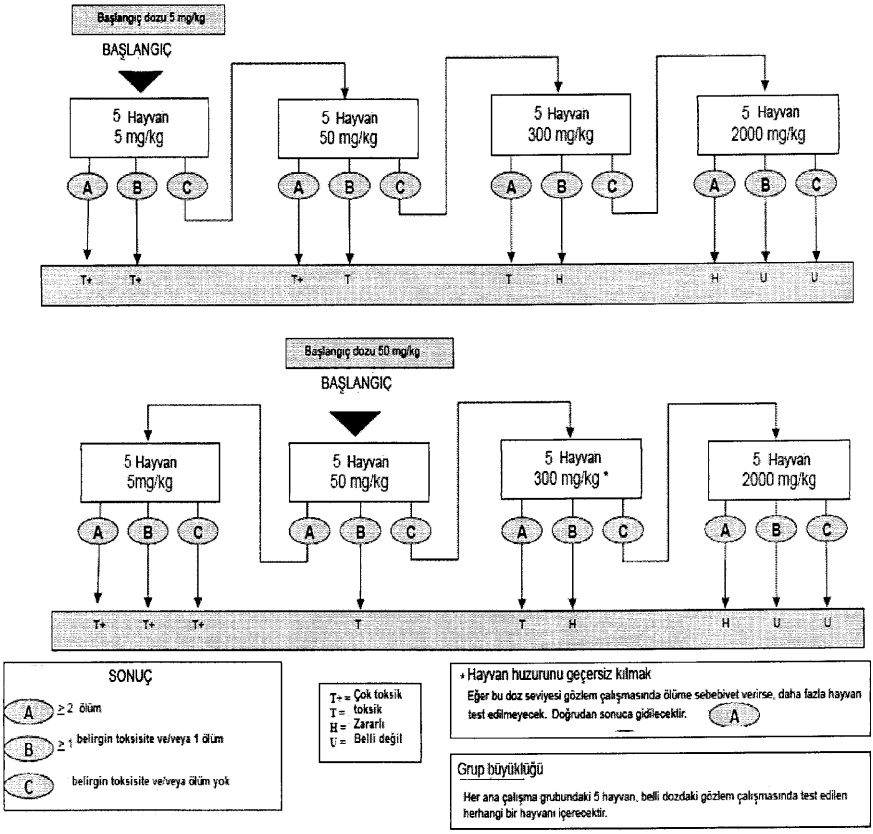
İstisnai olarak ve sadece özel düzenleyici gerekliliklerle mazur gösterildiği zaman, 5000 mg/kg'lık ilave üst doz düzeyininin kullanılması düşünülebilir. Hayvan sağlığının korunmasının gerekli olduğunu bilindiğinden 5000 mg/kg dozunda test uygulanması uygun bulunmamıştır ve sadece böyle bir testin sonuçlarının hayvan ve insan sağlığını korumakla doğrudan ilgili olduğuna dair kuvvetli bir olasılık varsa kullanımı düşünülmelidir (9).

Gözlem çalışması
Sıralı bir protokol sağlayan karar verme kuralları Ek 1'de gösterilmiş ve 5000 mg/kg dozunu de kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Bu yüzden, gözlem çalışmasının başlangıç dozu olarak 5000 mg/kg kullanıldığında 2000 mg/kg'da ikinci bir hayvanın test edilmesi için sonuç A'nın (ölüm) gerçekleşmesi gerekir; sonuç B ve C (belirgin toksisite veya toksisite yok) 5000 mg/kg'lık asıl çalışma başlangıç dozu olarak seçilmesini sağlar. Benzer olarak, 5000 mg/kg dışında bir başlangıç dozu kullanıldığında 2000 mg/kg'da sonuç B ve C'de testin uygulanması 5000 mg/kg'a kadar ilerler, sonrasında 5000 mg/kg'da sonuç A asıl çalışmanın başlangıç dozu olarak 2000 mg/kg'ı ve sonuç B ve C ise asıl çalışmanın başlangıç dozu olarak 5000 mg/kg'ı göstermelidir

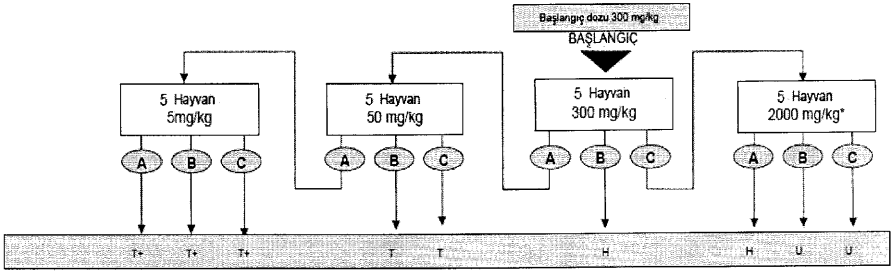
Asıl çalışma
Sıralı bir protokol sağlayan karar verme kuralları Ek-II'de gösterilmiş ve 5000 mg/kg dozunu da kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Bu yüzden, asıl çalışmanın başlangıç dozu olarak 5000 mg/kg kullanıldığında 2000 mg/kg'da ikinci bir grubun test edilmesi için sonuç A'nın (≥2 ölüm) gerçekleşmesi gerekir; sonuç B (belirgin toksisite ve/veya ≤1 ölüm) veya C (toksisite yok) maddenin GHS'ye göre sınıflandırılamaması ile sonuçlanır. Benzer olarak, 5000 mg/kg dışında bir başlangıç dozu kullanıldığında 2000 mg/kg'da sonuç C'de testin uygulanması 5000 mg/kg'a kadar ilerler sonrasında 5000 mg/kg'da sonuç A maddenin GHS Kategori 5'e göre sınıflandırıldığını, sonuç B ve C ise maddenin sınıflandırılamadığını göstermelidir.

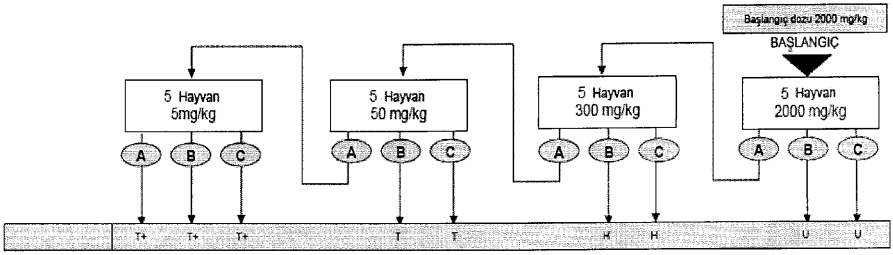
Ek-IV

TEST YÖNTEMİ B.1 bis: Küresel Harmonize edilmiş Sistem (GHS) tam anlamıyla uygulanana kadar geçiş dönemini kapsayan Avrupa Birliği şemasına göre sınıflandırma Yönergesi (Kaynak 8' den alınmıştır)



TEST YÖNTEMİ B.1 bis: Küresel Harmonize edilmiş Sistem (GHS) tam anlamıyla uygulanana kadar geçiş dönemini kapsayan Avrupa Birliği şemasına göre sınıflandırma Yönergesi (Kaynak 8' den alınmıştır)





SONUÇ

A ≥ 2 ölüm

B ≥ 1 belirgin toksisite ve/veya 1 ölüm

C belirgin toksisite ve/veya ölüm yok

T+ = Çok toksik
T = toksik
H = Zararlı
U = Belli değil

• Hayvan huzurunu geçersiz kılmak

Eğer bu doz seviyesi gözlem çalışmasında ölüme sebebiyet verirse, daha fazla hayvan test edilmeyecek. A Doğrudan sonuca gidilecektir.

Grup büyüklüğü

Her ana çalışma grubundaki 5 hayvan, belli dozdaki gözlem çalışmasında test edilen herhangi bir hayvanı içerecektir.

B.1 tris AKUT ORAL TOKSİSİTE- AKUT TOKSİK SINIF YÖNTEMİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 423 (2001) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu testte beyan edilen akut toksik sınıf yöntemi (1) basamak başına tek cinsiyetten 3 hayvanın kullanıldığı adım adım uygulanacak bir işlemdir. Hayvanların ölüm ve/veya ölmeye yakın durumda olmalarına bağlı olarak ortalama test maddesinin akut toksisitesine karar vermek için 2-4 basamak gerekli olabilir. Bu işlem tekrarlanabilirdir, yöntemde çok az hayvan kullanılır ve maddeleri diğer akut toksisite test uygulama yöntemlerindekilere banzer şekilde düzenleyebilir. Akut toksik sınıf yöntemi maddenin sınıflandırılma amacıyla düzenlenmesini ve zarar değerlendirmesinin yapılmasını olanaklı kılmak için uygun şekilde ayrılmış sabitlenmiş dozlu biyometrik değerlendirmelere dayanır (2)(3)(4)(5),

Yöntem 1996'da kabul edilen haliyle, Ulusal (6) ve uluslararası (7) literatürlerden elde edilen LD_{50} verileri karşısında kapsamlı olarak canlı doku içinde yapılan şekliyle (*in vivo*)onaylanmıştır.

Belli bir amaca en uygun test yönteminin seçimi için Akut Oral Toksisite Test Uygulamaları Dokümanına (8) bakılarak bulunabilir. Bu Yönerge ayrıca B.1tris'teki Test Yöntemlerinin yürütülmesi ve yorumlanmalarına ilişkin ilave bilgiler de içermektedir.

Test maddelerinin aşındırıcı ve ciddi tahriş edici etkisine bağlı olarak, acı ve ağrı verdiği bilinen dozlarda uygulanmasına gerek yoktur. Ölmek üzere olan veya açıkça acı çeken veya bunun ciddi belirtilerini gösteren hayvanlar insani şekilde öldürülebilir ve test sonuçlarının yorumlanmasında da, testte ölen hayvanlarla aynı şekilde değerlendirilir. Ölmek üzere olan veya ciddi anlamda acı çeken hayvanların öldürülmesine karar verme kriterleri ve beklenen veya yaklaşan ölümlerin teşhis edilmesi ile ilgili kılavuz ayrı bir kılavuz dokümanın konusudur (9).

Yöntem, bir maddenin tasnifine ve akut toksisiteye neden olan kimyasalların sınıflandırılmasını sağlayan Küresel Uyumlaştırılmış Sistem'e (Globally Harmonised System, GHS) göre sınıflandırılmasına olanak sağlayan sonuçları ve önceden belirlenen dozları kullanır. (10). Prensip olarak yöntem, LD_{50}'nin hassas şekilde hesaplanmasını sağlamak amacıyla tasarlanmamıştır, fakat ölüm beklenen tanımlı maruz kalma aralıklarının belirlenmesini sağlar, çünkü hayvanların ölüm oranları bu test için varılacak önemli bir son noktadır. Yöntem sadece en az iki doz % 0'dan fazla % 100'den az ölümle sonuçlanırsa, LD_{50} değerinin belirlenmesine izin verir. Daha önceden belirlenen dozların, test maddesinden bağımsız olarak, farklı durumlarda gözlemlenen hayvan sayısına açıkça bağlı olan sınıflandırmayla birlikte kullanımı, laboratuvardan laboratuvara tutarlı ve tekrarlanabilir raporlama olanaklarını geliştirir.

Test uygulama laboratuvarı çalışmaya başlamadan önce, test maddesiyle ilgili ulaşılabilecek tüm bilgiyi göz önünde bulundurmalıdır. Böyle bir bilgi maddenin kimyasal yapısını, kimliğini, fizikokimyasal özelliklerini, maddeyle ilgili önceden yapılmış yapay ortamdaki (*in vitro)* veya canlı doku içindeki (*in vivo)* toksisite testlerini, yapısal olarak ilişkili maddelere ait

toksikolojik verilerini ve maddenin öngörülen kullanımını/kullanımlarını kapsayacaktır. Bu bilgi, testin insan sağlığını korumak amacıyla uygulandığı ve uygun başlangıç dozunun seçilmesine yardımcı olacağı hususunda tatmin olmak için gereklidir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Akut oral (ağızdan) toksisite: Bir maddenin ağız yoluyla 24 saat içinde tek veya çoklu dozlar halinde verildiğinde ortaya çıkan olumsuz etkilere işaret eder.

Gecikmiş ölüm: Hayvan 48 saat içinde ölmez veya ölmeye yakınmış gibi görünmez fakat 14-günlük gözlem süresinden sonra ölürse, gecikmiş ölüm anlamına gelir.

Doz: Uygulanan test maddesinin miktarıdır. Doz, test hayvanının birim ağırlığı başına düşen test maddesinin ağırlığı (örneğin, mg/kg) olarak ifade edilir.

GHS (Globally Harmonised System): Kimyasal Maddeler ve Karışımlar için Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi OECD'nin (insan sağlığı ve çevre), BM Tehlikeli Malların Taşınmasıyla ilgili Uzman Komitesi (fiziko-kimyasal özellikler) ve ILO (zarar iletişimi) ve Kimyasalların güvenli İdaresi için Kuruluşlararası Program (IOMC) ile birlikte yürüttüğü birleştirilmiş müşterek bir aktivitedir.

Yaklaşan ölüm: Planlanan bir sonraki gözlem zamanından önce beklenen ölüm veya ölüme yakın durum. Bu durumun kemirgenlerdeki belirtileri arasında çırpınma, yanal pozisyon, sırt üstü yatma ve titreme vardır (Daha fazla ayrıntı için İnsan Sonlanma Noktaları Dokümanına (Humane Endpoints Guidance) bakınız(9)).

LD_{50} (ortalama öldürücü doz): Oral yolla uygulandığında hayvanların %50'sinin ölümüne neden olması beklenen, maddenin istatiksel olarak türetilen tek dozu. LD_{50} değeri test hayvanının birim ağırlığı başına düşen test maddesinin ağırlığı olarak ifade edilir (mg/kg).

Sınır doz: Test uygulamalarında en üst sınırdaki doza (2000 veya 5000 mg/kg) karşılık gelir.

Ölmek üzere olma (Moribund) durumu: Ölme durumunda olma veya tedavi edilse de yaşama kabiliyetinin olmaması durumu (Daha fazla ayrıntı için İnsan Sonlanma Noktaları Dokümanına (Humane Endpoints Guidance) bakınız(9)).

Tahmini ölüm: Deneyin planlanan sonlanma zamanından önceki gelecekte bilinen bir zamanda ölüme dair klinik belirtilerin mevcut olması, örneğin: yiyecek ve su alamama durumu (Daha fazla detay için İnsan Sonlanma Noktaları Dokümanına (Humane Endpoints Guidance)bakınız (9).

1.3. Test yönteminin ilkesi

Bu testin ilkesi, her basamakta en az sayıda hayvanın kullanıldığı adım adım uygulanacak bir işleme dayanır, maddeyi sınıflandırabilmek için, test maddesinin akut toksisitesiyle ilgili yeterli miktarda bilgi elde edilir. Madde, bir grup deney hayvanına belirlenen dozlardan birinde ağız yoluyla uygulanır. Madde, adım adım test edilir, her bir basamakta tek cinsiyetten 3 hayvan kullanılır. (normalde dişiler). Herhangi bir basamakta doz uygulanan hayvanlarda, bileşiğe bağlı ölüm olup olmaması, ikinci basamağı belirleyecektir. Ör.;

- daha fazla teste ihtiyaç yoktur,
- üç ilave hayvana daha aynı doz uygulanması,
- üç ilave hayvana daha bir sonraki yüksek veya bir sonraki düşük doz uygulanması.

Test işlemleriyle ilgili detaylar Ek-I'de tanımlanmıştır. Yöntem, test maddesinin sabitlenmiş LD_{50} son verme değerleriyle tanımlanmış bir dizi toksisite sınıfına göre sınıflandırılması hakkında karar verilmesini olanaklı kılar.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hayvan türlerinin seçimi

Tercih edilen kemirgen türü sıçandır, ancak diğer kemirgen türleri de kullanılabilir. Normalde dişiler kullanılır (9). Geleneksel LD_{50} testleriyle ilgili literatür taramaları, cinsiyetler arasında duyarlılıkları bakımından çok az farklılık olduğunu göstermiştir fakat farklılıkların gözlendiği durumlarda dişiler, çok az da olsa daha duyarlıdırlar (11). Ancak, eğer yapısal olarak ilgili kimyasalların toksikolojik ve toksikokinetik özelliklerine ait bilgiler erkeklerin dişilerden daha duyarlı olduğunu gösterirse, böyle durumlarda erkekler kullanılmalıdır. Çalışma erkeklerle yürütülürse, gerekçe gösterilmelidir.

Yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşlarının, genç yetişkin ve sağlıklı olanları kullanılmalıdır. Dişilerin doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Doz uygulamasının başlangıcında her bir hayvan 8-12 haftalık olmalı ve ağırlıklar daha önceden doz verilen hayvanların ortalama ağırlıklarının ±%20'si aralığı içinde olmalıdır.

1.4.2. Barınma ve besleme koşulları

Deney hayvanları için oda sıcaklığı 22 °C (±3 °C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranının en az %30 olması ve tercihen %70'i geçmemesi gerekmesine rağmen, odanın temizlenmesi sırası dışında, nem olarak hedef %. 50-60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır. Beslenme için sınırsız içme suyu tüketimiyle beraber geleneksel laboratuar yiyecekleri kullanılabilir. Hayvanlar dozlara göre gruplandırılıp kafeslere yerleştirilebilinir ancak kafes başına düşen hayvan sayısı hayvanların net bir şekilde gözlenebilmesini etkilememelidir.

1.4.3. Hayvanların hazırlanması

Hayvanlar rastgele seçilirler, ayrı ayrı kimliklendirilmeleri için işaretlenirler ve deneyden en az beş gün öncesinden itibaren deneysel barınma ve beslenme koşullarında laboratuar ortamına alışmaları için deney kafeslerinde muhafaza edilirler

1.4.4. Dozların hazırlanması

Test maddeleri genellikle sabit hacimde, test edilecek doz aralığında yer alan çeşitli konsantrasyonlardaki dozlarda uygulanmalıdır. Sıvı bir son ürün veya karışım test edilirken, seyreltilmemiş test maddesinin kullanılması ör. sabit bir konsantrasyon sonrasında o maddenin risk değerlendirmesiyle daha ilgili olabilir ve bu bazı düzenleyici yetkili makamların ortaya koyduğu bir gerekliliktir. Her durumda da uygulama için maksimum doz hacmi aşılmamalıdır. Sıvının tek seferde uygulanabilecek maksimum hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır.

Kemirgenlerde hacim normalde 1ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir ancak sulu çözeltilerde 2ml/100g vücut ağırlığı düşünülebilir. Uygun olan heryerde dozun hazırlanma formülasyonuna bağlı olarak, sulu çözeltinin/süspansiyonun/emülsiyonun kullanılması tavsiye edilir, bunu tercih edilme sırasına göre yağda (örneğin, mısır yağı) çözeltinin/süspansiyonun/emülsiyonun kullanımı ve diğer taşıyıcılardaki mümkün çözelti kullanımı izler. Su dışındaki taşıyıcıların toksik özellikleri bilinmelidir. Kullanılacağı süre boyunca kararlılığı bilinmedikçe ve kabul edilebilir olmadıkça, dozlar, uygulamadan kısa bir süre önce hazırlanmalıdır.

1.5. İşlem

1.5.1. Dozların uygulanması

Test maddesi, tek doz olarak gavaj yöntemi kullanılarak sonda ile uygulanır veya uygun bir boşaltım tüpü kullanılarak uygulanır. Tek dozun mümkün olmadığı olağandışı durumlarda, daha küçük parçalar halinde, 24 saati geçmeyen periyotlarla verilmelidir. Hayvanlar doz uygulanmadan önce aç bırakılmalıdır (ör. sıçanda, gece boyunca su verilebilir fakat yiyecek verilmemelidir; farede de, 3-4 saat için su verilebilir fakat yiyecek verilmemelidir). Aç bırakılma süresini takiben hayvanlar tartılmalı ve test maddesi uygulanmalıdır. Madde uygulandıktan sonra sıçanlara 3-4 saat, farelere 1-2 saat yiyecek verilmeyebilir. Doz, bir sürenin üzerinde parça parça uygulandığında bu sürenin uzunluğuna bağlı olarak hayvanlara yiyecek ve su sağlanması gerekebilir.

1.5.2. Hayvan sayısı ve doz seviyeleri

Her basamakta üç hayvan kullanılır. Başlangıç dozu olarak kullanılacak olan doz 5, 50, 300 ve 2000 mg/kg vücut ağırlığındaki sabit dört dozdan birinden seçilir. Başlangıç dozu seviyesi doz uygulanan hayvanların bazılarında ölüm meydana getirebilecek doz olmalıdır. Ek-I'deki akış diyagramı, her bir başlangıç dozu için takip edilmesi gereken prosedürü tarif eder. İlaveten, Ek-IV, yeni Küresel Uyumlaştırılmış Sistem (Globally Harmonised System, GHS) uygulanıncaya kadar Avrupa Birliği (AB) sistemindeki sınıflandırma hakkında kılavuz içerir.

Mevcut bilgilerin, en yüksek dozda (2000 mg/kg vücut ağırlığı), ölümün ihtimal dâhilinde olmadığını öne sürdüğü durumlarda sınır testi yürütülmelidir. Test edilen maddeyle ilgili bilgi yoksa hayvan refahı nedenleriyle başlangıç dozu olarak 300 mg/kg vücut ağırlığı kullanılması tavsiye edilir.

Uygulama grupları arasındaki zaman aralığı toksisite belirtilerinin başlangıcı, süresi ve ciddiyeti göze alınarak belirlenir. Önceden doz uygulanan hayvanların sağ kaldıklarından emin oluncaya kadar hayvanların bir sonraki dozla muamele edilmeleri ertelenmelidir.

İstisnai olarak ve sadece özel düzenleyici gerekçelerle mazur gösterildiği zaman, 5000 mg/kg'lık ilave üst doz düzeyinin kullanılması düşünülebilir. (bakınız Ek-II). Hayvan huzuru ilgili kaygılar nedeniyle hayvanları GHS Kategori 5 aralığında (2000-5000 mg/kg) teste tabi tutmak uygun bulunmamıştır ve sadece böyle bir testin sonuçlarının, hayvan ve insan sağlığını ve çevreyi korumayla doğrudan ilgili olduğuna dair kuvvetli bir olasılık varsa kullanımı düşünülmelidir

1.5.3. Sınır testi

Sınır testi öncelikle deneyi yapan kişinin test maddesinin toksik olmadığını gösteren ör. sadece düzenleyici sınır dozlarının üzerinde toksisitesi olduğuna dair, bilgiye sahip olunduğu durumlarda yapılır. Test maddesinin toksisitesiyle ilgili bilgi test edilen benzer bileşikler veya benzer karışımlar veya ürünler hakkındaki bilgilerden, toksikolojik önemi olan bileşenin yüzdesi ve tanımı dikkate alınarak elde edilir. Toksisiteyle ilgili herhangi bir bilginin olmadığı veya test maddesinin toksik olmasının beklendiği durumlarda asıl test yapılmalıdır.

2000 mg/kg vücut ağırlığı dozunda bir sınır testi altı hayvanla (her basamak için üç hayvan) yürütülebilir. İstinai olarak 5000 mg/kg'lık tek dozda bir sınır testi üç hayvanla yürütülebilir (bakınız Ek-II). Eğer test maddesine bağlı olarak ölüm meydana geliyorsa bir sonraki düşük dozla ilave bir test yürütülmesine ihtiyaç duyulabilir.

1.6. Gözlemler

Hayvanlar doz uygulandıktan sonra ilk 30 dakika boyunca en az bir defa, ilk 4 saatte daha dikkatlice olmak üzere ilk 24 saat içinde düzenli olarak ve bundan sonra 14 gün boyunca her gün bireysel olarak gözlemlenir. Hayvanlar çalışmadan çıkartılmaları ve insancıl olarak öldürülmeleri gerektiğinde veya ölü bulundukları zaman bu uygulamaya devam edilmez.Ancak gözlem süreleri asla değişmeyecek şekilde sabitlenmemelidir. Bu süre, toksik reaksiyonlarla, bu reaksiyonların başlangıç zamanlarıyla ve iyileşme süresinin uzunluğuyla belirlenmelidir, bu yüzden de gerekli olduğu düşünüldüğünde bu süre uzatılabilmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlarla, ölüm zamanları, özellikle de ölümlerin geç gerçekleşmesi eğilimi varsa, önemlidir (12). Her bir hayvan için ayrı ayrı elde edilen verilerle birlikte tüm gözlemler sistematik olarak kaydedilmelidir.

Eğer hayvanlar toksisite belirtileri göstermeye devam ederse ilave gözlemler yapılması gerekecektir. Gözlemler ciltteki, kürkteki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki değişikliklerle, solunum, dolaşım, otonomik ve merkezi sinir sistemindeki, somatomotor aktivite ve davranış değişikliklerini kapsamalıdır Titreme, çırpınma, tükürük salgılanması, ishal, uyuşukluk, uyku ve koma ile ilgili gözlemlere özellikle dikkat edilmelidir.

İnsan Sonlanma Noktaları ile ilgili Rehber Belgede özetlenen(9) ilkeler ve kriterler dikkate alınmalıdır. Ölmek üzere olan, acı ve ağrı çeken hayvanlar insani şekilde öldürülmelidir. Hayvanlar insani nedenlerle öldürüldüğünde veya ölü bulunduklarında ölüm zamanları olabildiğince hassas şekilde kaydedilmelidir.

1.6.1. Vücut ağırlığı

Bütün hayvanların ayrı ayrı ağırlıkları, madde uygulanmadan kısa bir süre önce ve sonrasında, en azından haftalık olarak tayin edilmelidir. Ağırlık değişiklikleri hesaplanmalı ve kaydedilmelidir. Test sonunda sağ kalan hayvanlar da tartılır ve insani şekilde öldürülür.

1.6.2. Patoloji

Tüm test hayvanlarına (test sırasında ölenler veya hayvan huzuru nedeniyle testten uzaklaştırılan hayvanlar dâhildir) tam teşekküllü otopsi yapılmalıdır. Her bir hayvan için bütün büyük çaplı patolojik değişiklikler kaydedilmelidir. 24 ya da daha fazla saattir sağ kalan

hayvanlarda organların mikroskobik incelemeleri büyük çapta patoloji kanıtıysa, bu incelemeler yararlı bilgiler sunabilir.

2. VERİLER

Veriler her bir hayvan için ayrı ayrı sağlanmalıdır. Ayrıca, veriler, her bir test grubu için kullanılan hayvan sayısını, toksisite belirtileri gösteren hayvanların sayısını, test sırasında ölü bulunan veya insani nedenlerle öldürülen hayvan sayısını, hayvanlar için ayrı ayrı ölüm zamanlarını, toksik etkilerin tanımını, tersinir olup olmadıklarını ve otopsi bulgularını gösterecek şekilde tablo halinde özetlenmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test maddesi:
- fiziksel özelliği, saflığı ve anlamlı ise fizikokimyasal özellikleri (izomerizasyon dâhil)
- CAS numarasını da içerecek şekilde tanımlama verileri,

Taşıyıcı, (eğer uygunsa):
- Sudan farklıysa taşıyıcı seçimi için gerekçe,

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk,
- biliniyorsa, hayvanın mikrobiyolojik durumu;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti (gerekirse, dişilerin yerine erkek hayvanların kullanılma gerekçeleri);
- hayvanların kaynakları, barınma koşulları, diyet, vs.

Test koşulları:
- uygulanan maddenin fiziksel hali de dahil test maddesinin formülasyonuyla ilgili detaylar;
- dozun uygulandığı hacim ve doz uygulama zamanı dahil test maddesinin uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- yiyecek ve su kalitesiyle ilgili detaylar (diyet türü/kaynağı, su kaynağı dahil);
- başlangıç dozunun seçimi için gerekçe.

Sonuçlar:
- tepki verilerinin ve doz seviyelerinin her bir hayvan için çizelgesi (ör. etkilerin doğası, şiddeti ve uzunluğu ve ölüm dahil toksik belirtileri gösteren hayvanlar);
- vücut ağırlığı ve vücut ağırlığı değişikliklerinin çizelgesi;
- dozun uygulandığı gün, sonrasında haftalık aralıklarla ve ölümdeki veya yaşamlarını sonlandırmalardaki her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı;

- planlanan gözden çıkarılmalardan önce gerçekleşen ölümlerin tarihi ve zamanı;
- zehirlenme belirtilerinin başlangıç zamanı ve bu belirtilerin her bir hayvan için tersinir olup olmadığı,
- mevcutsa, her bir hayvan için otopsi bulguları ve histopatolojik bulgular

Sonuçların tartışılması ve yorumlanması

Yorumlar.

4. KAYNAKLAR

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, 129-134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

Ek-I

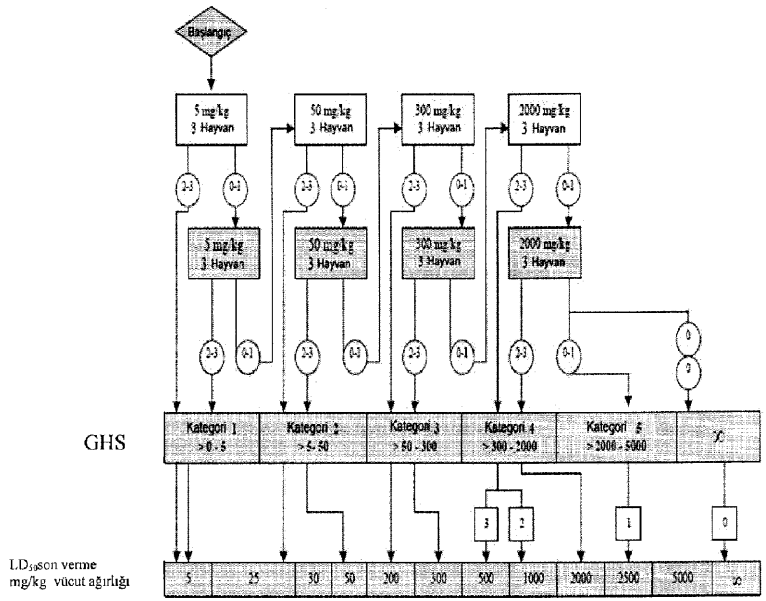
Her bir başlangıç dozu için takip edilecek işlem

GENEL AÇIKLAMALAR

Her başlangıç dozu için, takip edilecek işlemi çevreleyen bu Ekteki ilgili test uygulama planı:
— Ek-I a: Başlangıç dozu 5 mg/kg va (vücut ağırlığı)
— Ek-I b: Başlangıç dozu 50 mg/kg va (vücut ağırlığı)
— Ek-I c: Başlangıç dozu: 300 mg/kg va (vücut ağırlığı)
—Ek-I d: Başlangıç dozu: 2000 mg/kg va (vücut ağırlığı)
İnsanca öldürülen veya ölen hayvanların sayısına bağlı olarak, test prosedürü belirtilen oklara göre yürütülür.

Ek-I-A

5 mg/kg vücut ağırlığı ile test işlemi

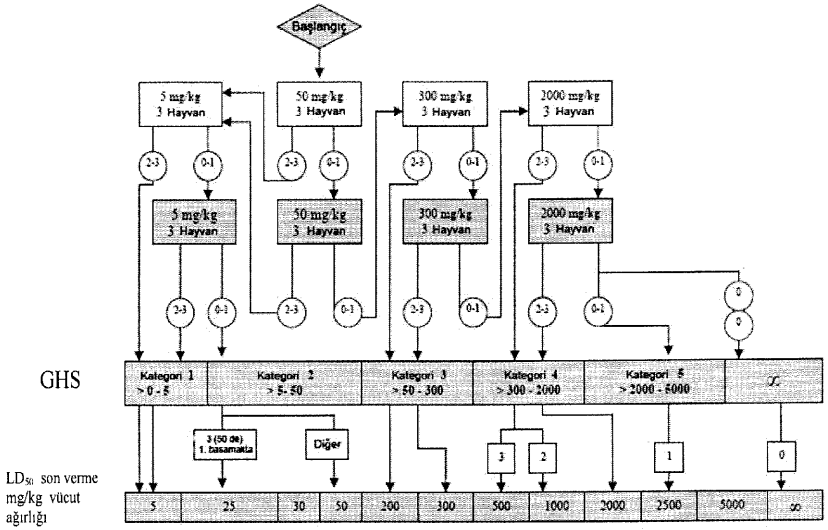


- basamak başına tek bir cinsten 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı
- GHS Küresel Harmonize edilmiş Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vücut ağırlığı)

- ∞: sınıflandırılmamış
- 5000 mg/kg vücut ağırlığında yapılantest Bakınız Ek-II

Ek-I-B

50 mg/kg vücut ağırlığı başlangıç dozu ile test işlemi

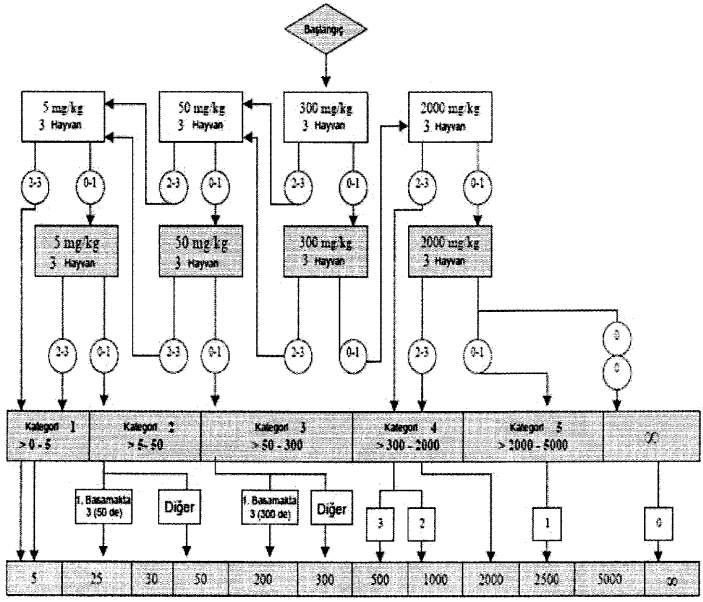


- basamak başına tek bir cinsten 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı
- GHS: Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vüc. ağ.)

- ∞: sınıflandırılmamış
- 5000 mg/kg vücut ağırlığında yapılan test. Bakınız Ek-II

Ek-I-C

300 mg/kg vücut ağırlığı başlangıç dozu ile test işlemi

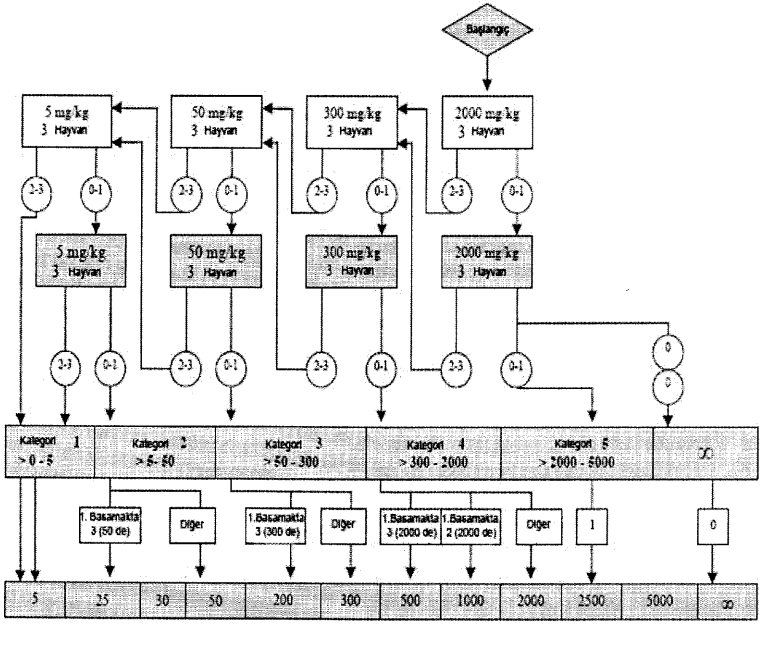


- basamak başına tek bir cinsten 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı
- GHS: Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vüc. ağ.)

- ∞: sınıflandırılmamış
- 5000 mg/kg vücut ağırlığında yapılanest. Bakınız

Ek-I-D

2000 mg/kg vücut ağırlığı başlangıç dozu ile test işlemi



- basamak başına tek bir cinsten 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı
- GHS: Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vüc. ağ.)

- ∞: sınıflandırılmamış
- 5000 mg/kg vücut ağırlığında yapılan test. Bakınız Ek-II

Ek-II

Beklenen LD_{50} değerleri 2000 mg/kg'ın üzerinde olan test maddelerinin test edilmelerine gerek olmadan sınıflandırılma kriterleri

Tehlike Kategorisi 5 için kriterler düşük akut toksisite tehlikesi olan, fakat belli koşullarda zayıf popülasyonlar üzerinde tehlikeli olabilecek test maddelerinin tanımlanmasını olanaklı kılmayı amaçlamaktadır. Bu maddelerin oral veya dermal LD_{50} değerlerinin 2000–5000 mg/kg arasında olması beklenir. Diğer yollar için de bu değerler eşdeğer dozlardır.

Test maddeleri 2000 mg/kg < LD_{50}< 5000 mg/kg olarak tanımlanan tehlike kategorisinde (GHS, Kategori 5) aşağıdaki durumlar söz konusu olduğunda sınıflandırılabilirler:

a) ölümün meydana geliş sıklığına dayanarak, Ek-II'nin herhangi bir test uygulama planına göre bu kategoriye yönlendirilmişse,

b) daha önceden mevcut olan güvenilir kanıtlara göre LD_{50} değeri Kategori 5 değerlerinin aralığı içindeyse veya hayvan çalışmaları veya insanlardaki toksik etkiler insan sağlığı açısından akut doğalı kaygılara işaret ediyorsa,

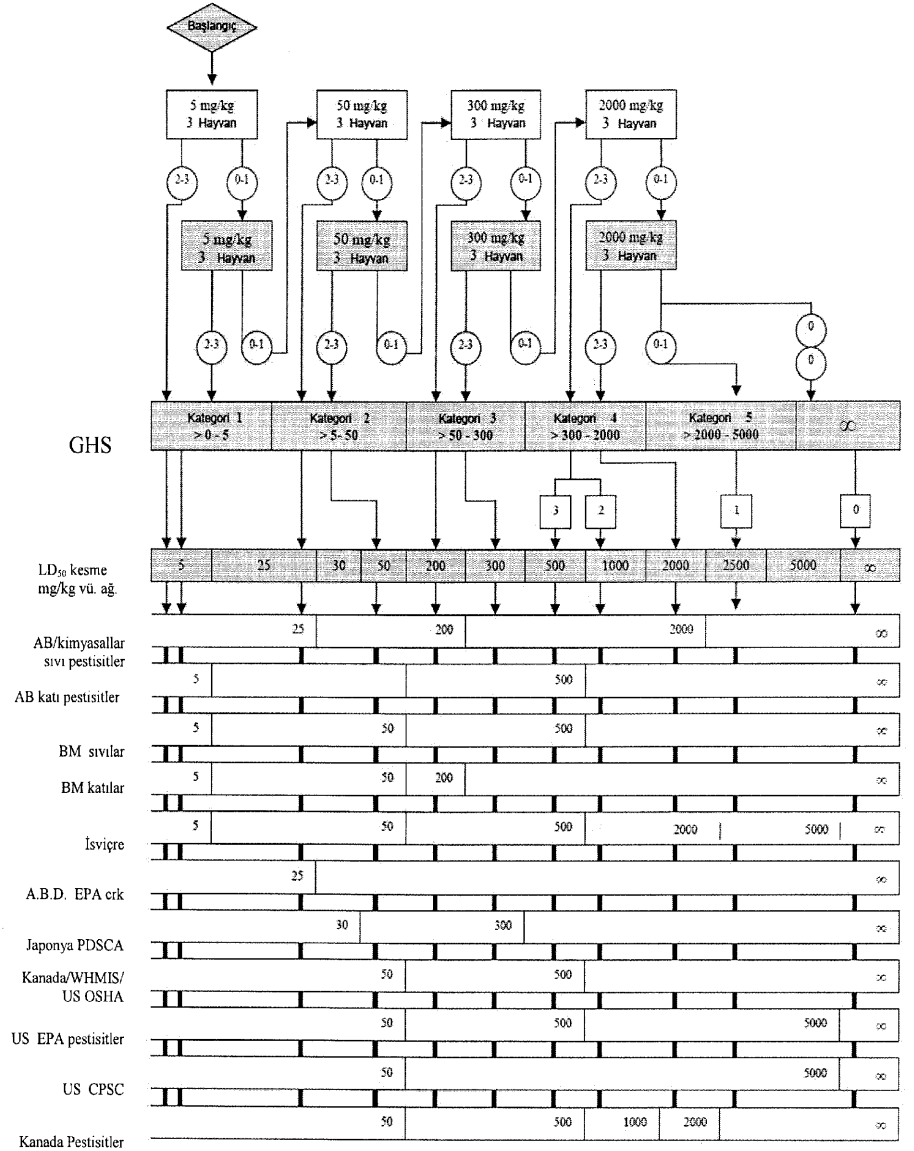
c) verilerin ekstrapolasyonu, tahmini ve ölçülmesi sırasında daha tehlikeli bir sınıfa geçişe izin verilmiyorsa ve
— insanda anlamlı toksik etkilerin gözlendiğine işaret eden güvenilir bilgi mevcutsa veya
— Kategori 4 değerlerine kadar test uygulandığında, oral yolla herhangi bir ölüm gözlenirse veya
— Kategori 4 değerlerine kadar test uygulandığında, uzman kararının toksisite belirtilerini, ishal, piloereksiyon veya dağınık, tımarlanmamış görünüm haricinde, teyit ettiği durumlarda veya
— uzman değerlendirmesinin diğer hayvan çalışmalarından elde edilen anlamlı akut etki potansiyeline işaret eden güvenilir bilgiyi teyit ettiği durumlarda.

2000 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda testin uygulanması

Hayvan huzurunu korumanın gerekli olduğu bilindiğinden hayvanlara Kategori 5 (5000 mg/kg) aralığında test uygulanması uygun bulunmamıştır ve sadece böyle bir testin sonuçlarının hayvan ve insan sağlığını korumakla doğrulan ilgili olduğuna dair kuvvetli bir olasılık varsa kullanımı düşünülmelidir (10). Daha yüksek doz seviyelerinde test yürütülmemelidir. 5000 mg/kg için test uygulanması gerektiğinde, sadece bir basamak (ör. üç hayvan) gereklidir. Doz uygulanan ilk hayvan ölürse, 2000 mg/kg'da doz uygulaması Ek-I'deki akış diyagramına göre yürütülür. İlk hayvan sağ kalırsa, ilave iki hayvana daha doz uygulanır. Eğer sadece üç hayvandan biri ölürse, LD_{50} değerinin 5000 mg/kg'ı geçmesi beklenir. Eğer her iki hayvan da ölürse, doz uygulaması 2000 mg/kg.'da sürer.

Ek-III

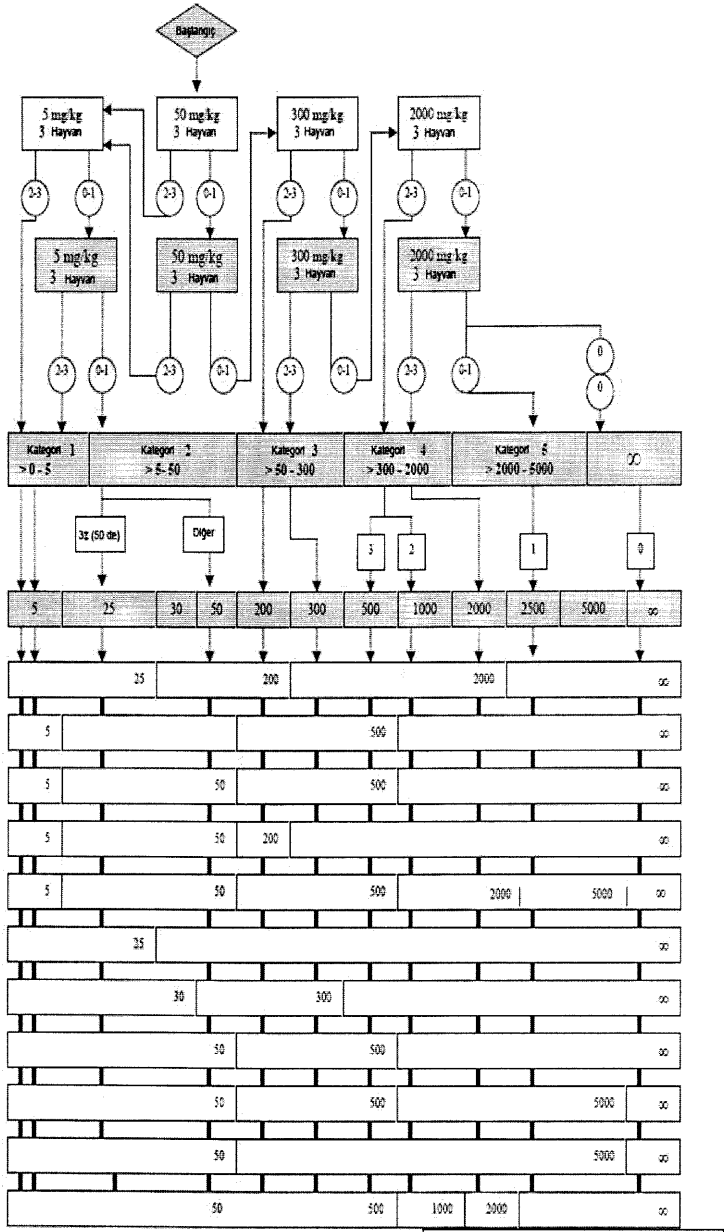
TEST YÖNTEMİ B.1 Tris: Küresel Harmonize edilmiş Sistem (GHS) tam anlamıyla uygulanana kadar geçiş dönemini kapsayan Avrupa Birliği şemasına göre sınıflandırma Yönergesi (Kaynak 8' den alınmıştır)



- basamak başına 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı

- ∞: sınıflandırılmamış
- GHS, Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vücut ağırlığı)

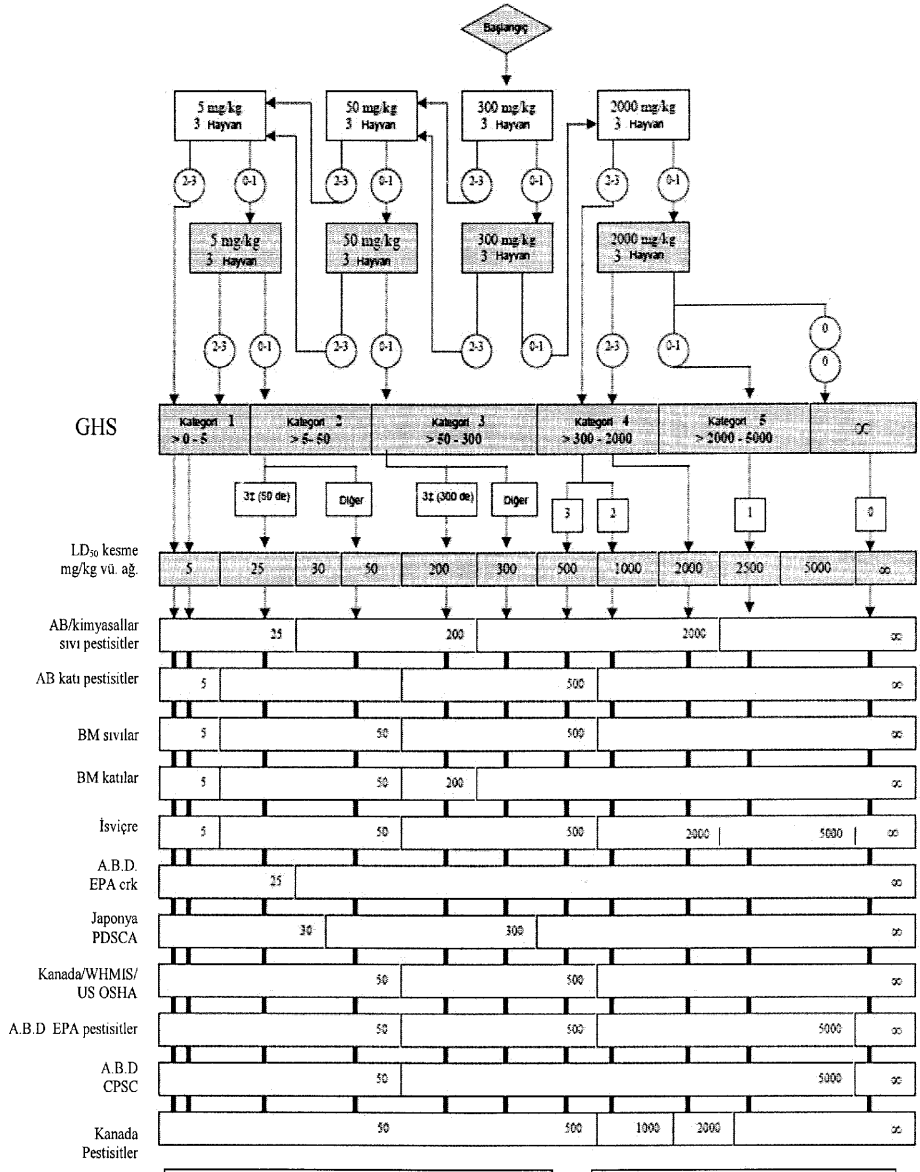
TEST YÖNTEMİ B.1 Tris: Küresel Harmonize edilmiş Sistem (GHS) tam anlamıyla uygulanana kadar geçiş dönemini kapsayan Avrupa Birliği şemasına göre sınıflandırma Yönergesi (Kaynak 8' den alınmıştır)



- basamak başına 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı

- ∞: sınıflandırılmamış
- : 1 Basamakta
- GHS, Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vücut ağırlığı)

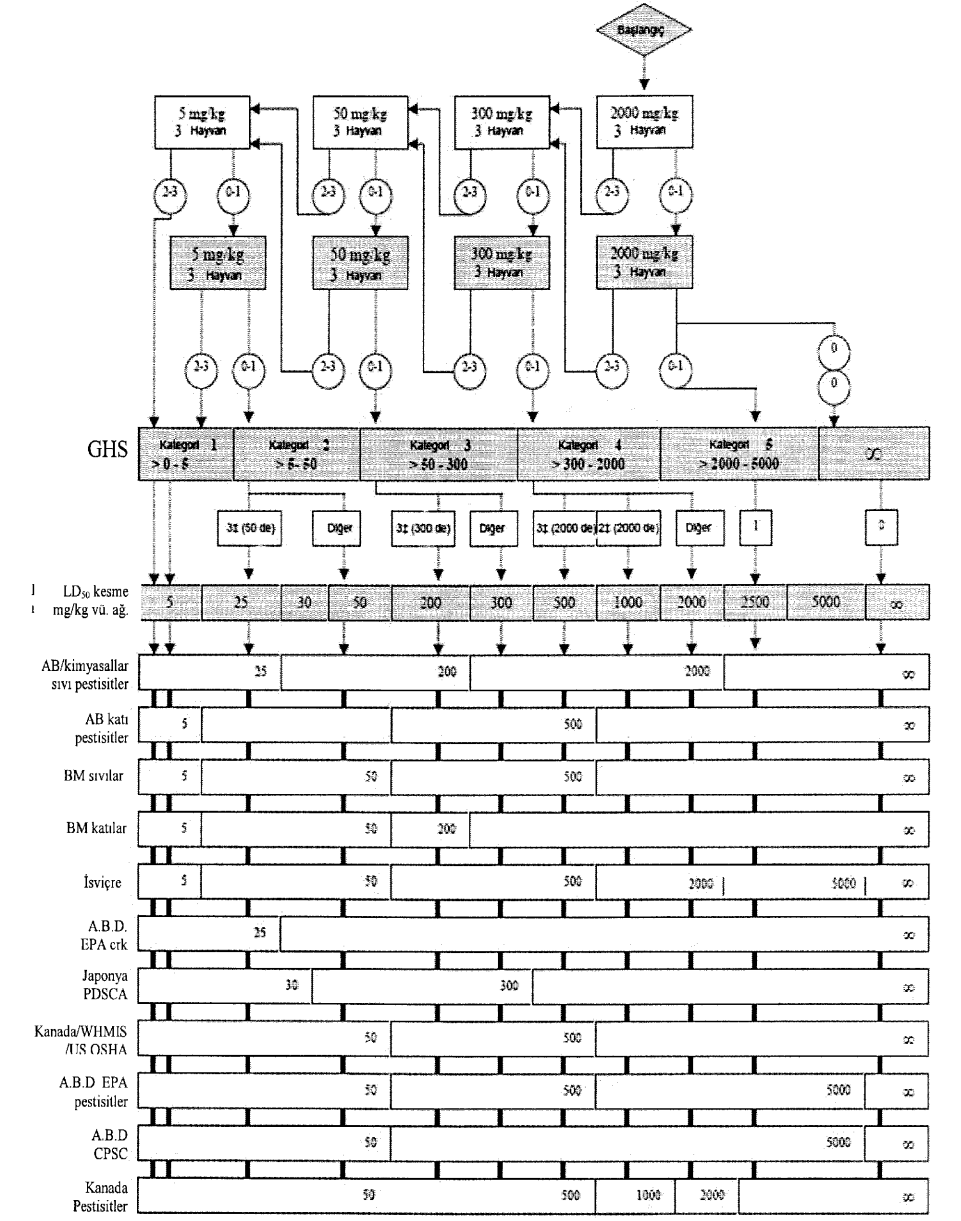
TEST YÖNTEMİ B.1 Tris: Küresel Harmonize edilmiş Sistem (GHS) tam anlamıyla uygulanana kadar geçiş dönemini kapsayan Avrupa Birliği şemasına göre sınıflandırma Yönergesi (Kaynak 8' den alınmıştır)



- basamak başına 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı

- ∞: sınıflandırılmamış
- : Birinci Basamakta
- GHS, Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vücut ağırlığı)

TEST YÖNTEMİ B.1 Tris: Küresel Harmonize edilmiş Sistem (GHS) tam anlamıyla uygulanana kadar geçiş dönemini kapsayan Avrupa Birliği şemasına göre sınıflandırma Yönergesi (Kaynak 8' den alınmıştır)



- basamak başına 3 hayvan (normal olarak dişiler) kullanılır
- 0, 1, 2, 3: Her basamaktaki ölmek üzere olan veya ölü hayvanların sayısı

- ∞: sınıflandırılmamış- :Birinci Basamakta GHS, Küresel Uyumlaştırılmış Sınıflandırma Sistemi (mg/kg vücut ağırlığı)

B.2 AKUT TOKSİSİTE (SOLUMA İLE)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Maddenin parçacık büyüklük dağılımı, buhar basıncı, erime noktası, kaynama noktası, parlama noktası ve uygulanabiliyorsa patlayıcılığı hakkında ön bilgi sahibi olmak faydalıdır.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok

1.4. Test yönteminin ilkesi

Çeşitli gruplardaki deney hayvanları belirlenensürelerde, kademeli derişimlerdeki test maddesine maruz bırakılır. Her grup için bir derişim uygulanır. Daha sonra etkilerin ve ölümlerin gözlemi yapılır. Test sırasında ölen hayvanlara ve deney sonunda hayatta kalan hayvanlara otopsi yapılır.

Ciddi, devam eden sıkıntı ve acı belirtileri gösteren hayvanların insanca öldürülmeleri gerekebilir. Aşındırıcı veya tahriş edici özellikleri sebebiyle belirgin ağrı ve acı veren maddelerin test maddesi dozu olarak kullanılmasına devam edilmesine gerek yoktur.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yöntemlerinin tanımı

1.6.1. Hazırlıklar

Hayvanlar deneyden en az beş gün öncesinden itibaren deneysel barınma ve beslenme koşullarında muhafaza edilirler. Test öncesinde, sağlıklı genç hayvanlar rastgele ve gerek duyulan grup sayılarına göre ayrılırlar. Kullanılmakta olan maruz bırakma teçhizatının tipi ile belirtilmemişse, bu hayvanların taklit edilmiş maruz kalmaya konu olmasına gerek yoktur.

Uygun büyüklükte parçacıklar elde etmek için, katı test maddelerinin mikron mertebesinde küçültülmesi gerekebilir.

İhtiyaç duyulan durumlarda, test maddesinin ortamda uygun derişimde olmasını sağlamak için test maddesine uygun bir taşıyıcı ilave edilebilir, sonrasında taşıyıcı kontrol grubu da kullanılmalıdır. Dozun verilmesini kolaylaştırmak için taşıyıcı veya başka katkı maddeleri

kullanılacaksa, bu maddelerin toksik etki göstermemeleri gerektiği bilinmelidir. Uygunsa geçmişe dayalı veriler kullanılabilinir.

1.6.2. Test Koşulları

1.6.2.1. Deney Hayvanları

Karşı endikasyonlar görülmedikçe tercih edilen tür sıçandır. Yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşları kullanılmalıdır. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin ±% 20'sini geçmemelidir.

1.6.2.2. Sayı ve Cinsiyet

Her bir konsantrasyon düzeyi için en az 10 kemirgen (beş dişi ve beş erkek) kullanılır. Dişilerin doğum yapmamış olması ve hamile olmamaları gereklidir.

Not: Kemirgenlerden daha yüksek sınıftaki hayvanlarla yapılan akut toksisite deneylerinde daha az sayıda hayvan kullanılması göz önünde bulundurulmalıdır. Dozlar dikkatlice seçilmeli ve kısmen toksik olan doz değerlerini geçmemelidir. Bu tür testlerde, test maddesinin öldürücü doz değerlerinin uygulanmasından kaçınılmalıdır.

1.6.2.3. Maruz kalma konsantrasyonları

Maruz kalma konsantrasyonları sayıca yeterli olmak şartıyla, (en az üç) ve test gruplarında toksik etki ve ölüm oranı aralığı oluşturacak şekilde aralıklandırılmalıdır. Veriler, derişim ölüm eğrisi oluşturabilecek yeterlilikte olmalı ve olanaklı durumlarda kabul edilebilir bir LC_{50} belirlenmesine imkân vermelidir.

1.6.2.4. Sınır testi

Eğer beş erkek ve beş dişi test hayvanına dört saat boyunca uygulanan 20 mg/l gaz veya 5 rug/litre (veya bunun test maddesinin patlayıcılık özelliği dâhil fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak mümkün olmadığı durumlardaki maksimum ulaşılabilir derişim) aerosol veya parçacık 14 gün boyunca bileşiğe bağlı ölüm meydana getirmiyorsa, ilave test yapılmasına gerek duyulmayabilir.

1.6.2.5. Maruz kalma süresi

Maruz bırakma süresi dört saat olmalıdır.

1.6.2.6. Donanım

Hayvanlar, yeterli oksijen içeriği ve eşit olarak dağılmış maruz kalma atmosferi temin etmek için saat başına en az 12 kez hava değişikliğinde dinamik hava akışı sağlamak amacıyla tasarlanmış soluma donanımıyla test edilmelidirler. Bu amaçla test hayvanlarının sıkışmaması ve test maddesine solunum yoluyla maruz kalmaları için tasarlanmış bir odacık kullanılmıştır. Genel bir kural olarak, odacığın atmosferinin kararlılığını sağlamak amacıyla test hayvanlarının toplam 'hacimleri' test odacığının hacminin % 5'ini geçmemelidir. Odacıkta ayrı ayrı "ağız ve buruna" ait, "sadece baş" veya tüm bedene maruz bırakma uygulanabilir, ilk ikisi test maddesinin başka yollarla alımını azaltmaya yardımcı olur.

1.6.2.7. Gözlem süresi

Gözlem süresi en az 14 gün olmalıdır. Ancak gözlem süreleri asla değişmeyecek şekilde sabitlenmemelidir. Bu süre, toksik reaksiyonlarla, bu reaksiyonların başlangıç hızlarıyla ve iyileşme süresinin uzunluğuyla belirlenmelidir, bu yüzden de gerekli olduğu düşünüldüğünde bu süre uzatılabilmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlarla ölüm zamanları özellikle de ölümlerin geç gerçekleşmesi eğilimi varsa, önemlidir

1.6.3. İşlem

Maruz bırakılmadan kısa bir süre önce hayvanlar tartılır ve belirlenen donanımın içinde, odacığın konsantrasyonu dengeye ulaştıktan sonra, dört saat test derişimine maruz bırakılır. Dengeye ulaşma zamanı kısa olmalıdır. Testin uygulandığı sıcaklık 22 ± 3 °C olmalıdır. İdeal olarak bağıl nem oranı da % 30 ve %70 arasında olmalıdır, fakat bazı aerosollerin testleri gibi belli örneklerde bu durum uygulanabilir olmayabilir. Odacığın içindeki düşük (önemsiz derecedeki) negatif basınç (≥ 5 mm su) test maddesinin, çevreleyen alanın içine sızmasını engeller. Maruz kalma süresince gıda ve su verilmemelidir. Test atmosferinin meydana getirilmesi ve izlenmesi için uygun sistemler kullanılmalıdır. Sistem, kararlı maruz kalma koşullarını olabildiğince hızlı bir şekilde sağlamalıdır. Odacık öyle bir şekilde tasarlanmalıdır ki test ortamının homojen dağılımı sağlanmalıdır.

Aşağıda belirtilenler için ölçüm veya kontrolleri yapılmalıdır:

(a) hava akışının hızı (sürekli).

(b) test maddesinin nefes alma bölgesindeki mevcut derişimi maruz bırakma sırasında en az üç kere ölçülür. (bazı ortamların, örneğin yüksek derişimli aerosollerin daha sık kontrollerle izlenmeye gereksinimi vardır)

Maruz bırakma süresi boyunca derişim, ortalama değerin % ±15'inden daha fazla değişkenlik göstermemelidir. Ancak bazı aerosollerin söz konusu olduğu durumlarda, bu şekilde seviye kontrollerinin yapılması mümkün olmayabilir, bu durumda daha geniş bir aralık kabul görür. Aerosoller için, parçacık boyutu analizi gerekli sıklıkta gerçekleştirilmelidir (her test grubu başına en az bir adet)

(c) sıcaklık ve nem, mümkünse sürekli.

Maruz bırakma sırasında ve maruz bırakılmayı takiben gözlem yapılır ve yapılan gözlemler sistematik olarak kaydedilir, kayıtlar her bir hayvan için ayrı ayrı tutulmalıdır. İlk gün boyunca gözlemler sık aralıklarla yapılmalıdır. Her çalışma gününde en az bir defa dikkatli bir klinik inceleme yapılmalıdır. Diğer gözlemler günlük olarak, çalışmadaki hayvan kaybını en aza indirecek –ölü bulunan hayvanların dondurulması veya otopsisi, zayıf ya da ölmek üzere olan hayvanların ayrılması veya gözden çıkarılması gibi- önlemler alınarak gerçekleştirilmelidir.

Gözlemler deri ve tüylerdeki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki, solunum, dolaşım, otonom ve merkezi sinir sistemindeki değişikliklerle somatomotor aktivite ve davranıştaki değişiklikleri kapsamalıdır.

Solunum, titreme, çırpınma, tükürük salgılanması, ishal, uyuşukluk, uyku ve koma ile ilgili gözlemlere özellikle dikkat edilmelidir. Ölüm zamanları olabildiğince hassas bir şekilde kaydedilmelidir. Hayvanların ağırlıkları ayrı ayrı maruz bırakılmalardan sonra haftalık olarak ve ölüm anında belirlenmelidir.

Üst ve alt solunum yolundaki herhangi bir değişikliğe referansla, test sırasında ölen hayvanlara ve testin bitiminde sağ kalan hayvanlara otopsi yapılır. Bütün büyük patolojik değişiklikler kaydedilmelidir. Belirtilen durumlarda dokular histopatolojik incelemeye tabi tutulmalıdırlar.

2. VERİLER

Veriler, her bir test grubu için testin başlangıcındaki hayvan sayısı, hayvanlar için ayrı ayrı ölüm zamanları, başka toksisite belirtileri gösteren hayvanların sayısı, toksik etkilerin tanımı ve otopsi bulgularını gösterecek şekilde tablo halinde özetlenmelidir. Sağ kalımlar bir günü geçiyorsa, ağırlıktaki değişiklikler hesaplanmalı ve kaydedilmelidir. Maruz bırakılan bileşikten kaynaklanan acıya ve sıkıntıya bağlı olarak insani şekilde öldürülen hayvanlar, bileşiğe bağlı ölümler olarak kaydedilirler. LC_{50} tanınmış bir yöntemle belirlenmelidir.

Verilerin değerlendirilmesi, eğer varsa, hayvanların test maddesine maruz bırakılmaları ile tüm anomalilerin sıklığı ve ciddiyeti arasındaki ilişkileri, davranışsal ve klinik anomalileri, büyük yaraları, vücut ağırlığı değişikliğini, ölüm ve diğer toksik etkileri de içine alarak kapsamalıdır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- tür, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli vs.;
- test koşulları: maruz kalma aletinin tanımı, tasarımı,tipi, boyutları, hava kaynağı, aerosol üretme sistemi, havalandırma yöntemi ve bu alet kullanıldığında test odacıklarındaki hayvanların barınma yöntemini kapsamalıdır. Sıcaklık, nem, aerosol konsantrasyonu ve parçacık büyüklüğü dağılımı ölçüm ekipmanı tanımlanmalıdır.

Maruz kalma verileri
Veriler tablo haline getirilmeli ve ortalama değerler ve standart sapma gibi değişkenlik ölçümleriyle birlikte sunulmalıdır ve mümkünse,
(a) Soluma ekipmanındaki hava akış hızları
(b) Havanın nemi ve sıcaklığı;
(c) belirtilen derişimler (maruz kalma aletine verilen toplam test maddesi miktarının, toplam hava hacmine bölümü)
(d) taşıyıcının yapısı, eğer kullanıldıysa;
(e) test solunum bölgesindeki mevcut derişim
(f) Kütle Orta Değer Aerodinamik Çap (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD) ve geometrik Standard sapma (Geometrical Standard Deviation, GSD);

(g) dengeye ulaşma süresi;
(h) maruz bırakma süresi;

- cinsiyet ve maruz kalma düzeyine bağlı olarak gelişen cevaplarla ilgili verilerin tablo haline getirilmesi (test sırasında ölen veya öldürülen hayvanların sayısı; toksisite belirtileri gösteren hayvanların sayısı; maruz kalan hayvanların sayısı);
- maruz bırakılma sırasında veya maruz bırakılmayı takiben ölüm zamanı, hayvanları insanca öldürmek için gerekçeler ve kriterler;
- tüm gözlemler;
- gözlem süresinin sonunda her iki cinsiyet için de elde edilen LC50 değeri (belirtilen hesaplama yöntemiyle birlikte);
- sağlanabilen durumlarda, LC50 için % 95 güven aralığı;
- yöntemin belirlenmesini sağladığı yerlerdeki doz/ölüm eğrisi ve eğimi;
- otopsi bulguları;
- herhangi bir histopatolojik bulgu;
- sonuçların tartışılması (test sırasında insani şekilde öldürülen hayvanların hesaplanan LD50 değeri üzerindeki etkisine özellikle dikkat edilmelidir);
- sonuçların yorumlanması,

ifadelerini içermelidir.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.3 AKUT TOKSİSİTE (DERİ YOLU İLE)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test edilecek madde, çeşitli gruplardaki deney hayvanlarının derisine günlük olarak kademeli dozlarda, her grup için bir doz kullanılacak şekilde uygulanır. Daha sonra, etkiler ve ölümler gözlenir. Test sırasında ölen hayvanlara ve deney sonunda hayatta kalan hayvanlara otopsi yapılır.

Ciddi, devam eden sıkıntı ve acı belirtileri gösteren hayvanların insanca öldürülmeleri gerekebilir. Test maddesi uygulanırken, maddenin aşındırıcı veya tahriş edici özellikleri nedeniyle göze çarpan bir acı ve sıkıntının dikkate alınması gerekir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yöntemlerinin tanımlanması

1.6.1. Hazırlıklar

Hayvanlar deneyden en az beş gün öncesinden itibaren deneysel barınma ve beslenme koşullarında deney kafeslerinde muhafaza edilirler. Test öncesinde sağlıklı, genç, yetişkin hayvanlar rastgele uygulama gruplarına ayrılırlar. Testten yaklaşık 24 saat önce, kürk kırpılarak veya traş edilerek hayvanın gövdesinin sırt bölgesinden uzaklaştırılmalıdır. Kürk kırpılırken veya traş edilirken, geçirgenliğini değiştirebileceği için deriye zarar vermekten kaçınılmalıdır. Vücut yüzeyinin % 10'undan az olmayacak bir alan test maddesinin uygulanması için temizlenir. Eğer uygunsa toz haline getirilebilen katı maddeler test edilirken, test maddesi, deriye iyi temas etmesi için yeterli miktarda suyla veya gerekli durumlarda uygun bir taşıyıcıyla ıslatılmalıdır. Bir taşıyıcı kullanıldığında, taşıyıcının test maddesinin deriden geçişi üzerine etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Sıvı haldeki test maddeleri genellikle seyreltilmemiş halde kullanılmalıdır.

1.6.2. Test koşulları

1.6.2.1. Deney hayvanları

Yetişkin sıçan veya tavşan kullanılabilir. Diğer türler de kullanılabilir ancak kullanım gerekçeleri belirtilmelidir. Yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşları kullanılmalıdır. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin ±% 20'sini geçmemelidir.

1.6.2.2. Sayı ve cinsiyet

Her bir doz düzeyi için en az 5 hayvan kullanılır. Hayvanların hepsinin aynı cinsiyette olması gerekir. Eğer dişiler kullanılıyorsa, doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Cinsiyetin önemli olduğunun vurgulandığı durumlarda, bu cinsiyetten hayvanlara doz uygulaması yapılmalıdır.

Not: Kemirgenlerden daha yüksek sınıftaki hayvanlarla yapılan akut toksisite deneylerinde daha az sayıda hayvan kullanılması düşünülmelidir. Dozlar dikkatlice seçilmeli ve orta şiddetteki toksik dozları geçmemelidir. Bu tür testlerde, test maddesinin öldürücü doz değerlerinin uygulanmasından kaçınılmalıdır.

1.6.2.3. Doz seviyeleri

En az üç doz düzeyinde olmak üzere sayıca yeterli olmalıdır ve test gruplarında toksik etki aralığı ve ölüm oranı hızları oluşturacak şekilde uygun aralıklara bölünmelidir. Doz seviyelerine karar verilirken tahriş edici veya aşındırıcı etkiler dikkate alınmalıdır. Veriler doz/cevap eğrisi oluşturmak için yeterli olmalı ve mümkün durumlarda kabul edilebilir bir LD_{50} tayinine izin vermelidir.

1.6.2.4. Sınır testi

En az 2000 mg/kg vücut ağırlığı doz seviyeli bir sınır testi 5 erkek ve 5 dişi hayvan üzerinde, yukarıda tanımlanan protokoller kullanılarak uygulanmalıdır. Eğer bileşiğe bağlı ölüm meydana geliyorsa detaylı bir çalışma yapılmasının göz önünde bulundurulması gerekebilir.

1.6.2.5. Gözlem süresi

Gözlem süresi en az 14 gün olmalıdır. Ancak gözlem süreleri asla değişmeyecek şekilde sabitlenmemelidir. Bu süre toksik reaksiyonlarla, bu reaksiyonların başlangıç hızlarıyla ve iyileşme süresinin uzunluğuyla belirlenmelidir, bu yüzden de gerekli olduğu düşünüldüğünde bu süre uzatılabilmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlar ve ölüm zamanları, özellikle de ölümlerin geç gerçekleşmesi eğilimi varsa, önemlidir

1.6.3. İşlem

Hayvanlar ayrı ayrı kafeslere konmalıdırlar. Test maddesi, toplam vücut yüzey alanının %10'u bir alan üzerine düzgün bir biçimde uygulanır. Oldukça toksik maddelerle kaplanan yüzey alanı daha küçük olabilir fakat mümkün olduğunca geniş bir alan ince ve düzgün bir katman halinde kaplanmalıdır.

Test maddeleri 24 saatlik maruz kalma süresi boyunca tahriş etmeyen bir gazlı bezle deriye temas ettirilmelidir. Test yapılacak alan ayrıca gazlı bezi muhafaza etmek için uygun bir şekilde tekrar kaplanmalıdır ve hayvanların test maddesini yememeleri sağlanmalıdır. Test maddesinin yenmesini engellemek için koruyuculu tasmalar kullanılabilir ancak hayvanların tamamen hareketsiz olmaları tavsiye edilen bir yöntem değildir.

Maruz kalma süresinin sonunda, yapılabiliyorsa suyla veya uygun başka temizleme yöntemleriyle artık test maddesi ciltten uzaklaştırılmalıdır.

Gözlemler yapıldıkları gibi sistematik olarak kaydedilmelidirler. Her bir hayvan için ayrı kayıt tutulmalıdır. İlk gün boyunca sık aralıklarla gözlem yapılmalıdır. Her çalışma gününde en az bir defa dikkatli bir klinik inceleme yapılmalıdır, diğer gözlemler günlük olarak, çalışmadaki hayvan kaybını en aza indirecek –ölü bulunan hayvanların dondurulması veya otopsisi, zayıf ya da ölmek üzere olan hayvanların ayrılması veya gözden çıkarılması gibi önlemler alınarak gerçekleştirilmelidir.

Gözlemler deri ve tüylerdeki, uygulama yapılan derideki, gözlerdeki ve mukoz membranlardaki ayrıca solunum, dolaşım, otonom ve merkezi sinir sistemindeki değişikliklerle somatomotor aktivite ve davranış değişikliklerini kapsamalıdır.

Titreme, çırpınma, tükürük salgılanması, ishal, uyuşukluk, uyku ve koma ile ilgili gözlemlere özellikle dikkat edilmelidir. Ölüm zamanı olabildiğince hassas bir şekilde kaydedilmelidir.

Üst ve alt solunum yolundaki herhangi bir değişikliğe referansla, test sırasında ölen hayvanlara ve testin bitiminde sağ kalan hayvanlara otopsi yapılır. Bütün büyük patolojik değişiklikler kaydedilmelidir. Belirtilen durumlarda dokular histopatolojik incelemeye tabi tutulmalıdırlar.

Diğer cinsiyetteki toksisite değerlendirmesi için, çalışma bir cinsiyette tamamlandıktan sonra, en az 5 hayvandan oluşan bir gruba doz uygulanır ve bu cinsiyetteki hayvanların test maddesine belirgin şekilde daha hassas olmadıkları belirlenir. Daha az hayvanın kullanılması bağımsız koşullarda haklı bir gerekçeye dayandırılabilir. Test edilen hayvanın cinsiyetinin daha hassas olduğunun ispatlanması için yeterli bilginin mevcut olduğu yerlerde, diğer cinsiyete ait hayvanlar testlerden muaf tutulabilirler.

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu için, testin başlangıcındaki hayvan sayısını, hayvanların ayrı ayrı ölüm zamanlarını, başka toksisite belirtileri gösteren hayvan sayısını, toksik etkilerin ve otopsi bulgularının tanımını içeren bir tablo halinde özetlenmeli ve test maddesinin uygulanmasından kısa bir süre sonra, haftalık olarak ve ölüm sırasında kaydedilmelidir. Ağırlık değişiklikleri bir günü geçen sağ kalımlarda hesaplanmalı ve kaydedilmelidir. Bileşikten kaynaklanan acı ve sıkıntıya bağlı olarak insani şekilde öldürülen hayvanlar bileşiğe-bağlı ölüm olarak kaydedilirler. LD_{50} değeri tanınmış bir yöntemle belirlenmelidir.

Verilerin değerlendirilmesi, eğer varsa, hayvanların test maddesine maruz kalması ile tüm anomalilerin sıklığı ve ciddiyeti arasındaki ilişkileri, davranışsal ve klinik anomaliler, büyük vücut ağırlığı değişikliği, ölüm ve diğer toksik etkileri de içine alarak yapılmalıdır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- tür, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli vs.;
- test koşulları (cilt temizleme yöntemi ve pansuman şekli: emilmeye uygun veya değil);
- doz düzeyleri (kullanıldıysa, taşıyıcınınki de dahil ve konsantrasyon değerleriyle birlikte);
- doz uygulanan hayvanların cinsiyeti;
- cinsiyet ve doz yanında cevap verilerinin çizelgesi (ör. Test sırasında ölen veya öldürülen hayvan sayısı, toksisite belirtisi gösteren hayvan sayısı, maruz kalan hayvan sayısı);
- doz uygulandıktan sonraki ölüm zamanı, hayvanları insani şekilde öldürmek için gerekçeler ve kriterler;
- tüm gözlemler;
- kapsamlı bir çalışmada, nasıl belirlendiğinin anlatıldığı bir yöntemle 14 günde belirlenen, cinsiyete bağlı LD50 değeri;
- LD50 için % 95 güven aralığı (Sağlanabilen durumlarda);
- yöntemin belirlenmesini sağladığı yerlerdeki doz/ölüm eğrisi ve eğimi;
- otopsi bulguları;
- herhangi bir histopatolojik bulgular;
- testin diğer cinsiyet üzerindeki sonuçları;
- sonuçların tartışılması (test sırasında insani şekilde öldürülen hayvanların hesaplanan LD50 değeri üzerindeki etkisine özellikle dikkat edilmelidir);
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.4 AKUT TOKSİSİTE: DERİ TAHRİŞİ /AŞINMA

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 404 (2002) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Güncellenen bu yöntemin hazırlanmasında, hayvan refahı ile ilgili kaygılar nedeniyle ve deney hayvanı kullanılarak yapılan gereksiz testlerden kaçınmak için test maddesiyle ilgili tüm mevcut bilgilerin değerlendirilmesine ilişkin olarak mümkün olan gelişmeler özellikle dikkate alınmıştır. Bu yöntemde, maddenin aşındırıcı/tahriş edici özelliklerine ilişkin olarak tanımlanan canlı ortamda (in vivo) testi uygulanmadan önce, ilgili anlamlı verilerin varlığı için, delil ağırlığı analizi uygulanması tavsiye edilir. Verilerin yeterli olmadığı durumlarda, veriler bir dizi sıralı test uygulanarak geliştirilebilir (1). Test stratejisi geçerli ve kabul edilmiş yapay ortamda gerçekleştirilen (in vitro) testlerin performansını içerir ve bu yöntemin eki olarak sağlanmıştır. Ayrıca, uygunsa, canlı dokudaki (in vivo) başlangıç testi için birbirini izleyen, üç test yamasının hayvana aynı anda değil de arka arkaya uygulanması tavsiye edilir.

Gerek güvenilir bilim ve gerekse hayvan refahı açısından maddenin deride aşınma/tahriş potansiyeliyle ilgili, elde mevcut tüm veriler delilin delil ağırlığı (delilin ispat ve kuvvet analizi) analiziyle değerlendirilinceye kadar, canlı doku içindeki (in vivo) testlere başlanmamalıdır. Böyle veriler, insanda ve/veya laboratuar hayvanlarında yapılan mevcut çalışmalardan elde edilen kanıtları içerecektir. Bir veya daha fazla yapısal olarak ilişkili maddenin veya bu tür maddelerin karışımlarının aşınma/tahriş yaptığına dair kanıtlar, maddenin kuvvetli asit veya baz olduğuna dair verilerle(2)(3), geçerli ve kabul edilmiş yapay ortam (in vitro) veya canlı içinde olmayan (ex vivo) test sonuçlarıdır (4)(5)(5a). Bu analiz, önceden yapılan başka çalışmalardan elde edilmiş hakkında yeterli delil bulunan maddenin dermal aşınma/tahriş özelliği için gereken canlı doku içindeki (in vivo) test uygulamalarına ihtiyacı azaltmalıdır.

Aşınma/tahriş için uygulanan geçerli ve kabul edilmiş in vitro veya ex vivo testlerin uygulanmasını içeren, tercih edilen sıralı bir test yapma stratejisi, bu yöntemde Ek olarak yer almaktadır. Strateji geliştirilmiş ve OECD çalıştay katılımcıları tarafından tavsiye edilmiştir(6), tavsiye edilen test yapma stratejisi olarak Kimyasal Maddelerin Sınıflandırılması için Küresel Uyumlaştırılmış Sistem (Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances, GHS) içinde uyarlanmıştır(7). Bu test stratejisinin in vivo teste başlamadan önce izlenmesi tavsiye edilir. Yeni maddeler için, maddenin aşınma/tahriş etkisiyle ilgili verilerin bilimsel anlamda güvenilirliği için adım adım test uygulama yaklaşımı tavsiye edilir. Dermal aşınma/tahriş verilerinin yetersiz olduğu mevcut maddeler için, kullanılması gereken, strateji verilerindeki boşlukların doldurulmasıdır. Farklı test stratejisi veya prosedürle kullanımı veya adım adım test uygulama yaklaşımını kullanmama kararının gerekçeleri belirtilmelidir.

Eğer aşınmaveya tahrişin belirlenmesi bir delilin ispat kuvveti analizi yapılarak sağlanamıyorsa, sıralı test yapma stratejisi ile uyumlu bir in vivo test üzerinde düşünülmelidir. (Bakınız. Ek-I)

1.2. Tanımlar ve birimler

Deri tahrişi: test maddesinin 4 saat boyunca uygulanmasını takiben ciltte geri dönüşümlü hasarların oluşmasıdır.

Deride aşınma: test maddesinin 4 saat boyunca uygulanmasını takiben ciltte üstderi ve altderide gözlenen doku çürümesi gibi geri dönüşümsüz hasarların oluşmasıdır.

Aşındırıcı reaksiyonlar, ülserler, kanama, kanlı yara kabuklarıyla 14 günlük gözlemlerin sonunda, cildin ağartılmasına bağlı olarak renginin bozulması, saç dökülmesi ve yara izleriyle örnek gösterilebilir. Şüpheli yaralar için histopatolojik inceleme göz önünde bulundurulmalıdır.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Test edilen madde, deney hayvanının cildine tek doz olarak uygulanır. Test maddesinin uygulanmadığı alanlar kontrol olarak düşünülür. Tahriş/aşınma derecesi okunur ve belli aralıklarda derecelendirilir, etkilerin değerlendirilmesini sağlamak amacıyla ilave tanımlamalar yapılır. Çalışmanın süresi, gözlemlenen etkilerin geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olup olmadığının değerlendirilmesi için yeterli olmalıdır.

Testin herhangi bir aşamasında sürekli olarak ciddi acı ve/veya ağrı belirtileri gösteren hayvanlar insani bir şekilde öldürülmeli ve madde buna göre değerlendirilmelidir. Can çekişen ve ciddi acı çeken hayvanların insani anlamda öldürülmelerine karar verme kriterleri kaynak (8)'de yer almaktadır.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. In vivo test hazırlığı

1.4.1.1. Hayvan türlerinin seçimi

Albino tavşan tercih edilen laboratuar hayvanıdır ve sağlıklı genç yetişkin tavşanlar kullanılır. Diğer türleri kullanmak için gerekçe belirtilmelidir.

1.4.1.2. Hayvanların hazırlanması

Testten yaklaşık 24 saat önce, hayvanların sırt bölgesindeki kürk, deriye yakın şekilde kırpılarak uzaklaştırılmalıdır. Deriye zarar vermekten kaçınılmalı ve sadece sağlıklı, bozulmamış deriye sahip hayvanlar kullanılmalıdır.

Bazı tavşan ırklarının tüyleri yılın belli zamanlarında daha yoğun olabilir. Bu yoğun tüylerin bulunduğu alanlar test alanı olarak kullanılmamalıdır.

1.4.1.3. Barınma ve beslenme koşulları

Hayvanlar ayrı ayrı barındırılmalıdır. Oda sıcaklığı tavşanlar için 20°C (±3°C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranı en az %30 olmalı ve tercihen %70'i geçmemelidir, odanın temizlenmesi sırası dışında, hedef nem oranı %. 50-60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi 12 saat

aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde uygulanmalıdır. Beslenme için sınırsız içme suyu tüketimiyle beraber geleneksel laboratuar yiyecekleri kullanılabilir.

1.4.2. Test prosedürü

1.4.2.1. Test maddesinin uygulanması

Test maddesi deride küçük bir alana (yaklaşık 6 cm^2) uygulanmalıdır ve üzeri gazlı bir bez parçası ile kapatılarak tahriş etmeyen bir bantla sabitlenmelidir. Doğrudan uygulama yapılmasının mümkün olmadığı durumlarda (örneğin sıvılarda veya bazı macunlarda) test maddesi önce gazlı bez parçasına uygulanmalı, parça da daha sonra deriye uygulanmalıdır. Gazlı bez parçası (yama), maruz kalma süresince deriye uygun yarı-oklüzif bir sargı ile gevşek şekilde temas ettirilmelidir. Test maddesi gazlı bez parçasına uygulanmışsa, cilde iyi temas edecek şekilde tutturulmalıdır ve madde ciltte muntazam şekilde dağılmalıdır. Hayvanın gazlı bez parçasına erişimi, test maddesinin yenmesi veya solunması engellenmelidir.

Sıvı test maddeleri genellikle seyreltilmemiş olarak kullanılır. Gerekli olduğu düşünüldüğünde toz haline getirilebilen katı maddeler test edilirken, test maddesi çok az miktarda suyla (veya nerede gerekliyse, başka bir uygun taşıyıcıyla) ıslatılmalı, böylece cilde daha iyi temas etmesi sağlanmalıdır. Suyun dışında bir taşıyıcı madde kullanıldığında, taşıyıcının cildin test maddesiyle tahriş olmasındaki potansiyel etkisi en az olmalıdır (Normalde 4 saat olan maruz kalma süresinin sonunda test maddesi uzaklaştırılmalıdır). Pratik olan yerlerde, mevcut cevabı veya üstderinin bütünlüğünü değiştirmeden, su ya da uygun bir çözelti kullanılır.

1.4.2.2. Doz düzeyi

0,5 ml. sıvı veya 0,5 g katı veya macun haldeki madde, test yapılacak bölgeye uygulanır.

1.4.2.3. Başlangıç testi (Bir deney hayvanı kullanılan in vivo deri tahrişi/aşınması testi)

Uygulanacak in vivo testte başlangıç olarak bir hayvan kullanılması, özellikle de maddenin aşındırıcı potansiyelinin söz konusu olduğu durumlarda, kesinlikle tavsiye edilir. Bu, sıralı test uygulama stratejisiyle uygun olmalıdır (bakınız Ek 1).

Bir madde delilin ispat kuvveti analizine dayanarak aşındırıcı olarak tanımlanmışsa, ilave hayvan testi yapılmasına gerek yoktur. Aşındırıcı etkisi olduğundan şüphe edilen pek çok madde için ilave in vivo test uygulaması normalde gerekli değildir. Ancak, böyle durumlarda yetersiz delillerden dolayı ilave veriler garantilenmiş olduğundan aşağıdaki yaklaşımı takiben sınırlı hayvan testi yürütülebilir. Hayvana sırasıyla en fazla üç test yaması uygulanır. İlk yama üç dakikadan sonra kaldırılır. Eğer ciddi bir cilt reaksiyonu gözlenmemişse ikinci bir yama uygulanır ve bir saat sonra uzaklaştırılır. Bu aşamadaki gözlemler maruz bırakılmanın dört saate uzamasına etik anlamda izin veriyorsa, üçüncü yama uygulanır ve dört saatin sonunda uzaklaştırılır, tepki derecelendirilir.

Eğer aşındırıcı etki sırasıyla yapılan üç testin maruz kalımının herhangi birinden sonra gözlenmişse, test acilen sona erdirilir. Son yama kaldırıldıktan sonra da aşındırıcı bir etki gözlenmemişse, hayvan, daha önce aşınma meydana gelmezse 14 gün boyunca gözlenir. Test

maddesinin aşındırıcı etki göstermesinin beklenmediği ancak tahriş edici olabileceği böyle durumlarda, bir hayvana dört saat için bir yama uygulanmalıdır.

1.4.2.4. Doğrulama testi (İlave deney hayvanı kullanılan in vivo deri tahrişi testi)

Başlangıç testinde aşındırıcı bir etki gözlenmemişse, tahriş edici veya negatif cevap ikiye kadar ilave hayvan kullanılarak ve her birinde bir yama olacak şekilde, dört saatlik bir maruz kalma süresiyle doğrulanmalıdır. Başlangıç testinde tahriş edici bir etki gözlenirse, teyit testi sıralı şekilde veya aynı anda ilave iki hayvanı maruz bırakarak yürütülebilir. Başlangıç testinin olmadığı istisnai durumlarda, iki veya üç hayvan tek bir yamayla muamele edilir, yamalar dört saat sonra kaldırılır. İki hayvan kullanıldığında, eğer her ikisi de aynı cevabı gösteriyorsa, ilave teste gerek yoktur. Aksi takdirde, üçüncü bir hayvan da ayrıca test edilir. İlave deney hayvanları kullanılarak şüpheli tepkilerin değerlendirilmesine ihtiyaç duyulabilir.

1.4.2.5. Gözlem süresi

Gözlem süresinin uzunluğu, gözlenen etkilerin tamamen geri dönüşümlü olup olmadığının anlaşılması için yeterli olmalıdır. Hayvanların ciddi acı ve ağrı belirtileri göstermeye devem etmesi halinde deneye son verilmelidir. Etkilerin tersinirliğinin belirlenmesi için, hayvanlar yamalar kaldırıldıktan sonra 14 gün boyunca gözlenmelidir. 14 günden önce tersinirlik görülürse, deneye tersinirliğin görüldüğü anda son verilmelidir.

1.4.2.6. Klinik gözlemlerin ve cilt reaksiyonlarının derecelendirilmesi

Bütün hayvanlar ödem ve iltihap sonrası deride kızarma belirtileri için incelenmeli, tepkiler yama kaldırıldıktan sonra 60 dakika içinde ve sonrasında da 24., 48. ve 72. saatlerde kaydedilmelidir. Bir hayvandaki başlangıç testi için de test bölgesi ayrıca yama uzaklaştırıldıktan sonra incelenmelidir. Dermal reaksiyonlar derecelendirilir ve aşağıdaki Tabloda yer alan bu derecelendirmeye göre kaydedilir. Eğer ciltte 72 saatte tahriş veya aşınma olarak tanımlanmayan bir hasar varsa, etkilerin tersinirliğinin belirlenmesi için 14. güne kadar gözlem yapılması gerekebilir. Tahriş gözlenmesinin yanında deride bozulma ve sistemik olumsuz etkiler gibi (ör. Toksisitenin klinik belirtileri üzerine ve vücut ağırlığı üzerine etkiler) bütün lokal etkiler tüm detaylarıyla tanımlanmalı ve kaydedilmelidir. Şüpheli cevapları netleştirmek için histopatolojik inceleme yapılması göz önünde bulundurulmalıdır.

Ciltteki tepkilerin derecelendirilmesi ister istemez öznel olacaktır. Ciltteki derecelendirmelerin düzenlenmesini teşvik etmek ve gözlemlerin yorumlanmasını da içine alan test uygulama laboratuarlarına yardımcı olmak için, gözlemleri yapan personelin, kullanılan skorlama sistemi konusunda yeterli eğitimden geçmesi gerekir. (aşağıdaki Tabloya bakınız). Cilt tahrişini ve diğer yaraları derecelendirmek için resimli bir rehber yardımcı olacaktır (9).

2. VERİLER

2.1. Sonuçların sunumu

Çalışma sonuçları, en son test raporunda tablo halinde özetlenmeli ve 3.1'de listelenen tüm öğeleri kapsamalıdır.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi

Derideki tahriş dereceleri yaraların doğası ve ciddiyetiyle, geri dönüşümlü olup olmamalarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Dereceler tek başlarına maddenin tahriş edici özelliğiyle ilgili olarak mutlak bir standardı ifade etmezler, bunun yanında test materyalinin diğer özellikleri de ayrıca değerlendirilir. Bunun yerine, her bir derece, çalışmadan elde edilen diğer tüm gözlemlerle beraber değerlendirilmesi gereken referans değerler olarak sunulmalıdır.

Derideki yaraların tersinirliği, tahriş gibi tepkiler değerlendirilirken göz önünde bulundurulmalıdır. Sınırlı alanda saç dökülmesi (alopesi), üstderide kalınlaşmaya (hiperkeratosis) uzanmak üzere aşırı keratin oluşması, hücrelerin anormal çoğalması (hiperplazi) ve kepeklenme gibi sonuçlar 14-günlük gözlem süresi sonunda devam ediyorsa, test maddesinin tahriş edici olduğu düşünülür.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

in vivo testin yapılma gerekçesi: sıralı test uygulama strateji sonuçlarını da içeren önceden mevcut test verilerinin delil ispat kuvveti analizi ve sıralı test uygulama strateji sonuçlarını da kapsar:

- önceki testten elde edilen mevcut verilerle ilgili tanımları;
- test uygulama stratejisinin her aşamasından elde edilen verileri;
- uygulanan ve prosedürlerin detaylarını, test/referans madde ile elde edilen sonuçları kapsayan in vitro testlerin tanımlarını;
- in vivo çalışma yürütmek için delil ağırlığı analizini kapsar.

Test maddesi:
- tanımlama verileri (ör., CAS numarası; kaynak; saflık; bilinen safsızlıklar; seri numarası);
- fiziksel doğası ve fizikokimyasal özellikleri (ör. pH, uçuculuk, çözünürlük, kararlılık);
- eğer karışımsa, bileşim ve bileşenlerin bağıl yüzdeleri.

Taşıyıcı:
- tanımlama, derişim (uygunsa), kullanılan hacim;
- taşıyıcı seçimi için gerekçe

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk, albino tavşan dışında hayvan kullanımı için gerekçe;
- her iki cinsiyete ait hayvan sayısı;
- testin başında ve sonunda ayrı ayrı hayvan ağırlıkları;
- çalışmanın başındaki yaş;

- hayvanların kaynakları, barınma koşulları, diyet, vs.

Test koşulları:
- yama yeri hazırlama tekniği;
- kullanılan yama materyallerinin ve yama yapma tekniğinin detayları;
- test maddesinin hazırlanması, uygulanması ve uzaklaştırılmasıyla ilgili detaylar

Sonuçlar:
- her bir hayvan için ölçülen tüm noktalardaki tahriş/aşınma tepki skorlarının tablosu;
- gözlenen tüm yaraların tanımlanması;
- gözlenen tahriş veya aşınmanın doğasını ve derecesinin tarifi
- histopatolojik bulgular;
- dermal tahriş veya aşınmanın yanında diğer ters bölgesel etkiler (Örneğin , deride yağ kaybı) ve sistemik etkilerin tanımları.

Sonuçların tartışılması

4. KAYNAKLAR

(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. InVitro, 2, 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M.
(1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritant", 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., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin irritation. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483-524.
(5a) Test Yöntemi B.40 Cilt Aşınması.

(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://www1.oecd.org/ehs/test/background.html).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Hayvans Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm)

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990. [Available from OECD Secretariat upon request].

TABLO I: CİLT REAKSİYONLARININ DERECELENDİRİLMESİ

Deride kızarma ve kabuk oluşumu
Kızarıklık yok 0
Çok hafif kızarıklık (silik) 1
Belirgin kızarıklık 2
Orta şiddetten- ciddi kızarıklık 3
Ciddi kızarıklıktan (biftek kırmızılığı) kızarıklığın derecelendirilmesini önleyen kabuk oluşumuna. 4

Maksimum olasılık: 4

Ödem oluşumu
Ödem yok 0
Çok hafif ödem (silik). 1
Hafif ödem (alanın kenarları açık şekilde kaldırılarak iyice tanımlanır)... 2
Orta şiddette ödem (yaklaşık 1 mm'ye çıkar). 3
Ciddi ödem (1 mm'den daha fazla ve maruz kalan alanının üzerine çıkar..... 4

Maksimum olasılık: 4

Şüpheli cevapları netleştirmek için histopatolojik inceleme yürütülebilir.

Ek-I

Deride Tahriş ve Aşınma için Sıralı Test Uygulama Stratejisi

GENEL GÖRÜŞLER

Gerek güvenilir bilim ve gerekse hayvan refahı açısından, hayvanların gereksiz kullanımından kaçınmak ve hayvanlarda ciddi tepkiler meydana getiren testleri azaltmak önemlidir. Bir maddenin potansiyel olarak cildi aşındırmasına/tahriş etmesine ilişkin tüm bilgiler, in vivo testler üzerinde düşünülmeden önce değerlendirilmelidir. Bir maddenin dermal aşınma veya tahriş oluşturma potansiyelini sınıflandırmak için, önceden elde edilmiş yeterli bilgi olabilir ve test hayvanları üzerinde deney yapılmasına gerek kalmayabilir. Bu yüzden, delilin ispat kuvveti analizi ve sıralı test uygulama stratejisinin kullanılması in vivo testlere olan ihtiyacı, özellikle de madde ciddi reaksiyonlar meydana getirebilecek nitelikteyse, en aza indirecektir.

Maddenin cildi tahriş etme/aşındırma potansiyeli olup olmadığı hakkında karar vermek için mevcut bilgiler değerlendirilirken, in vivo dermal çalışmalar haricinde, ilave çalışmalar yürütülüp yürütülmeyeceğini belirlemek için delilin ispat kuvveti analizi kullanılması tavsiye edilir. İlave çalışmaların gerekli olduğu durumlarda, ilgili verilerin oluşturulması için sıralı test uygulama stratejisinin de kullanılması tavsiye edilir. Daha önce teste tabi tutulmamış kimyasalların dermal aşınma/tahriş potansiyelinin değerlendirmesinde kullanılacak verilerin geliştirilmesi için sıralı test uygulama stratejisi kullanılmalıdır. Bu ekte tarif edilen test uygulama stratejisi OECD çalıştayında geliştirilmiştir (1) ve daha sonra onaylanarak Kimyasal Maddelerin İnsan Sağlığı ve Çevreye Etkileri için Uyumlu Hale Getirilmiş Bütünleştirilmiş Tehlike Sınıflandırma Sistemi içinde genişletilmiştir, Kasım 1998'de 28 inci Kimyasallar Komitesi ortak toplantısı ve Kimyasallar Üzerinde Çalışma Grubu Toplantısında kabul edilmiştir(2).

Her ne kadar bu sıralı test uygulama stratejisi, test yöntemi B4'ün bütününü oluşturmuyorsa da ciltteki tahriş/aşınma karakteristiği belirlenmesi için tavsiye edilen yaklaşımı ifade eder. Bu yaklaşım, ciltte tahriş/aşınma için uygulanan in vivo testleri için hem en iyi pratik hem de etik bir değerlendirmedir. Test uygulama yöntemi, in vivo testlerin yürütülmesi için bir rehnberlik sağlar ve böyle bir teste başlamadan önce vurgulanması gereken faktörleri özetler. Strateji, test maddesinin cildi tahriş etme/aşındırma özelliklerinin mevcut verilerle değerlendirilmesi için bir yaklaşım ve ilave çalışmaya ihtiyaç duyulan veya hiçbir ilave çalışmaya gerek duyulmayan maddelerle ilgili verilerin oluşturulması için de kademeli bir yaklaşım sunar. Ayrıca özel koşullar altında geçerli ve kabul edilmiş in vitro veya ex vivo cilt aşınma/tahriş testlerinin uygulanmasını tavsiye eder.

TEST UYGULAMA STRATEJİSİNİN TANIMI VE DEĞERLENDİRMESİ

Testleri sıralı test uygulama stratejisinin (Şekil) bir kısmı olarak yürütmeye başlamadan önce, in vivo cilt testlerine ihtiyaç olup olmadığının belirlenmesi için mevcut tüm bilgiler değerlendirilmelidir. Her ne kadar anlamlı bilgi, tek bir parametrenin (pH uç değerleri) değerlendirilmesiyle elde edilebilse de mevcut bilgilerin tamamı göz önünde bulundurulmalıdır. Şüpheli maddenin veya benzerinin etkileriyle ilgili tüm veriler, delillin ispat kuvvet analizi ile karar verilerek ve bu karar için bir gerekçe sunularak değerlendirilmelidir. Maddeye dair elde mevcut olan insan ve hayvan verilerine öncelikli olarak önem verilmelidir. Bunu da in vitro ve ex vivo testlerden elde edilen veriler

izlemelidir. Aşındırıcı maddelere ait in vivo çalışmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. Test uygulama stratejisinde göz önünde bulundurulması gereken faktörler aşağıdaki gibidir:

(1. Basamak) İnsan ve hayvana ait var olan verilerin değerlendirilmesi. İnsanla ilgili mevcut veriler ör. Klinik veya mesleksel çalışmalar ve vaka raporları ve/veya tek veya tekrarlı dermal maruz kalma toksisite çalışmalarından elde edilen hayvan test verileri, göz önünde bulundurulmalıdır, çünkü bu şekilde cilt üzerindeki etkilerle doğrudan ilgili bilgi sağlanır. Aşındırıcılığı ve tahriş özelliği bilinen maddelerle bu özelliklerinin olmadığına dair çok net delillerin bulunduğu maddeler için in vivo çalışmalar yapılmasına gerek yoktur.

(2.Basamak) Yapı aktivite ilişkisinin analizi (Structure Activity Relationships, SAR). Yapısal olarak birbirleriyle ilişkili maddelere uygulanan testlerin sonuçları, eğer elde mevcutsa, göz önüne alınmalıdır. Yapısal olarak ilişkili maddelerle veya karışımlarla ilgili olarak ciltteki aşındırıcı/tahriş edici potansiyellerine dair elde yeterli insan ve/veya hayvan verileri mevcutsa, değerlendirilmekte olan maddenin aynı tepkileri meydana getireceği tahmin edilebilir. Böyle durumlarda, maddenin teste tabi tutulmasına gerek yoktur. Yapısal olarak benzer maddelerle veya böyle maddelerin karışımlarından elde edilen negatif veriler, sıralı test uygulama stratejisi altındaki bir maddenin tahriş edici ve aşındırıcı olmadığına karar vermek için yeterli değildir. Maddenin dermal aşındırma ve tahriş potansiyelini belirlemek için geçerli ve kabul edilmiş SAR yaklaşımları kullanılmalıdır.

(3.Basamak) Fizikokimyasal özellikler ve kimyasal reaktivite. pH uç değerleri ≤ 2.0 ve ≥ 11.5 şeklindeki maddeler kuvvetli bölgesel etkiler gösterebilirler. pH uç değeri bir maddenin ciltte aşındırıcı olup olmadığını belirlemek için temel alınıyorsa, o zaman maddenin asit/baz rezervi de (veya tampon kapasitesi) ayrıca dikkate alınmalıdır (3)(4). Tampon kapasitesine göre maddenin cilt üzerinde aşındırıcı etkisi olmayabileceği düşünülüyorsa, bunu teyit etmek için ilave testler-tercihen geçerli ve kabul edilmiş in vitro veya ex vivo- yürütülmelidir. (bakınız 5 ve 6ncı basamaklar).

(4. Basamak) Dermal toksisite. Bir kimyasalın deri yoluyla çok toksik olduğu ispatlanmışsa, in vivo dermal tahriş/aşınma çalışması, normal olarak uygulanan test maddesinin miktarı çok toksik dozu geçeceğinden ve hayvanların ciddi anlamda acı çekmesi veya ölümleriyle sonuçlanacağından, pratik olmayabilir. İlaveten, albino tavşanların kullanıldığı dermal toksisite çalışmaları önceden 2000 mg/kg vücut ağırlığı sınır dozunda veya daha yüksek dozlarda yürütüldüğünde ve hiçbir dermal tahriş veya aşınma görülmediğinde dermal tahriş ve aşınmayla ilgili ilave test yapılmasına gerek olmayabilir. Daha önceden yapılmış olan çalışmalarda akut dermal toksisite değerlendirilirken akla pek çok düşünce gelebilir. Örneğin, dermal yaralarla ilgili olarak rapor edilen bilgiler tam olmayabilir. Testlerin uygulanması ve gözlemler tavşan dışındaki bir türde uygulanabilir ve türlerin hassasiyet tepkileri farklılık gösterebilir.

Ayrıca hayvanlara uygulanan test maddesinin biçimi (örneğin test maddesinin dermal toksisite çalışması sırasında seyreltilmesi(5)) ciltte tahriş/aşınma değerlendirilmesi yapmak için uygun olmayabilir. Yine de, iyi tasarlanan ve yürütülen dermal toksisite çalışmalarının tavşanlarla uygulandığı durumlarda, maddenin aşındırıcı veya tahriş edici olmadığına dair negatif bulguların yeterli kanıt olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

(5. veya 6. Basamaklar) in vitro veya ex vivo testlerin sonuçları. Aşındırıcılık ve tahriş edicilik gibi özel etkilerin değerlendirilmesi için tasarlanan geçerli in vivo veya ex vivo testlerde aşındırıcı veya ciddi tahriş edici özelliği gösteren maddelerin (6)(7) hayvanlarda

denemesine gerek yoktur. Böyle maddelerin, benzer ciddi etkileri in vivo olarak da göstereceği önceden tahmin edilebilir.

(7. ve 8. Basamaklar) Tavşanlardaki in vivo test. In vivo test uygulamasına yönelebilmek için delilin ispatı kuvveti analizi yapılmalıdır. Teste bir hayvan kullanılarak, başlangıç testi ile başlanmalıdır. Bu testin sonuçları maddenin cilt üzerinde aşındırıcı olduğunu gösterirse, ilave testlere gerek yoktur. Başlangıç testinde aşındırıcı bir etki gözlenmemişse dört saatlik bir maruz kalma süresi boyunca ilave iki hayvan daha kullanılarak tahriş edici veya negatif tepki tespit edilmelidir. Başlangıç testinde tahriş edici etki gözlenirse, doğrulama testi sıralı test şeklinde veya aynı anda ilave iki hayvanı daha maruz bırakarak yürütebilir.

KAYNAKLAR

(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 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdail D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (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.

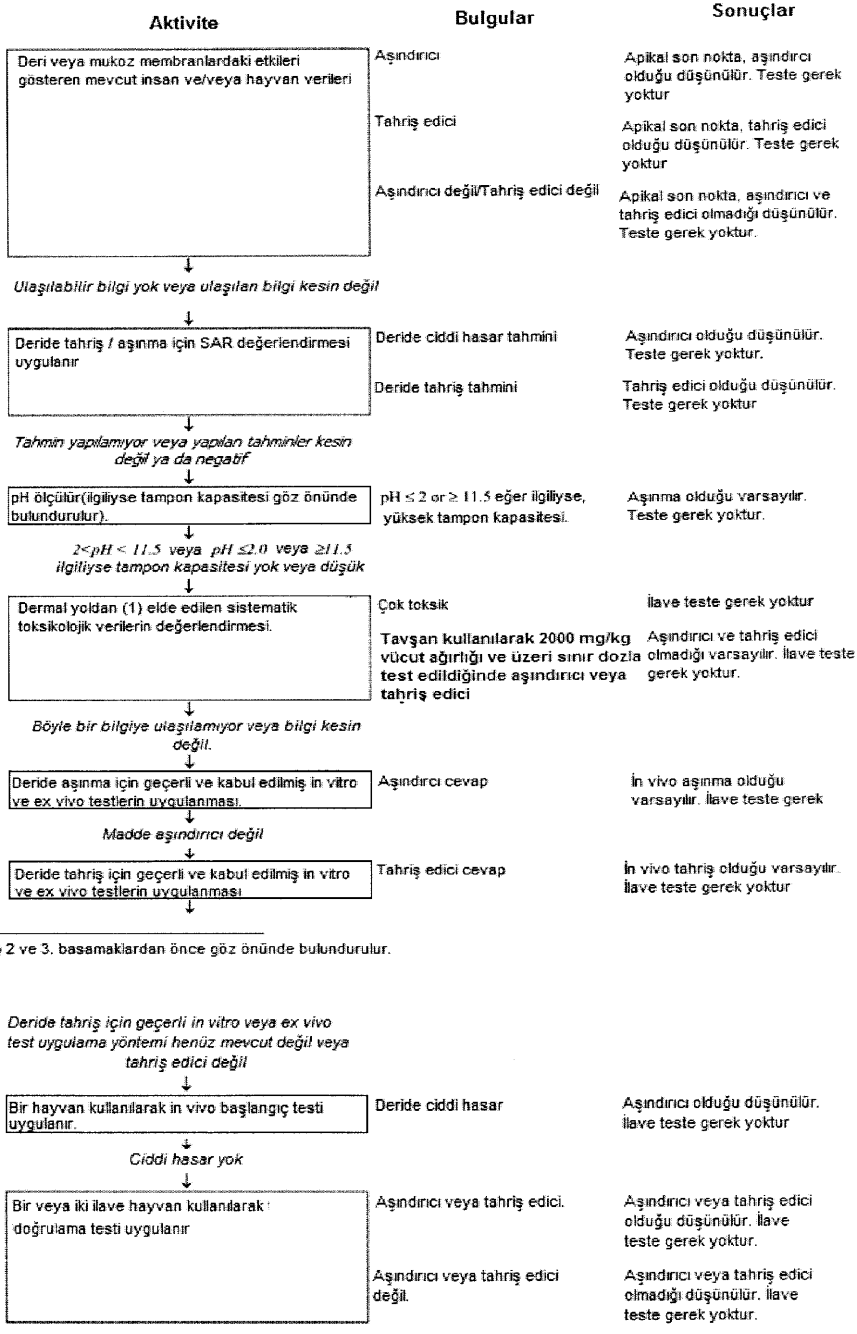
(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritancy, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.

(6) Testing Method B.40.

(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 corrosion. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483.524.

ŞEKİL

DERMAL TAHRİŞ VE AŞINMA İÇİN TEST UYGULAMA VE DEĞERLENDİRME STRATEJİLERİ



B.5 AKUT TOKSİSİTE: GÖZDE AŞINMA/TAHRİŞ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 405(2002)'ye eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Güncellenen bu yöntemin hazırlanmasında, hayvan refahıyla ilgili kaygılar nedeniyle ve deney hayvanı kullanılarak yapılan gereksiz testlerden kaçınmak için test maddesiyle ilgili tüm mevcut bilgilerin değerlendirilmesine ilişkin olarak mümkün olan gelişmeler özellikle dikkate alınmıştır. Bu yöntemde, maddenin aşınma/tahriş özelliğine ilişkin olarak tanımlanan in vivo (canlı organizma içi ortamı) testi uygulanmadan önce, ilgili mevcut verilerle ilgili olarak delilin ispat kuvveti analizi yapılması tavsiye edilir(1). Verilerin yeterli olmadığı durumlarda, veriler bir dizi sıralı test uygulanarak geliştirilebilir (2)(3). Test stratejisi geçerli ve kabul edilmiş in vitro testlerin uygulanmasını içerir ve bu yöntemde EK-I olarak yer alır. İlaveten, gözde aşınma olup olmadığını anlamak için, in vivo göz testi üzerinde düşünülmeden önce in vivo dermal tahriş/aşınma testinin uygulanması tavsiye edilir.

Gerek güvenilir bilim ve gerekse hayvan refahı açısından maddenin gözde aşınma/tahriş potansiyeliyle ilgili elde mevcut tüm veriler delilin ispat kuvveti analiziyle değerlendirilinceye kadar, in vivo testlere başlanmamalıdır. Böyle veriler insanda ve/veya laboratuvar hayvanlarında yapılan mevcut çalışmalardan elde edilen kanıtları içerecektir. Bir veya daha fazla yapısal olarak ilişkili maddenin veya böyle maddelerin karışımlarının aşınma/tahriş yaptığına dair kanıtlar, maddenin kuvvetli asit veya baz olduğuna dair verilerle(4)(5), ciltte aşınma ve tahriş için yapılan, geçerli ve kabul edilmiş in vitro veya ex vivo test sonuçlarıdır (6)(6a). Bu çalışmalar, delilin ispat kuvveti analizine önceden bağlı ya da onun bir sonucu olarak yürütülmüş olabilir.

Belli maddeler için böyle bir analiz, maddenin oküler (göz küresi) aşınma/tahriş potansiyeliyle ilgili in vivo çalışmalara ihtiyaç olduğunu işaret edebilir. Bu gibi durumların hepsinde in vivo göz testi yapılmasının üzerinde düşünülmeden önce, tercihen ilk önce maddenin dermal etkileriyle ilgili in vivo bir çalışma yürütülmelidir ve test yöntemi B.4'e göre değerlendirilmelidir (7). Delilin ispat kuvveti analizinin ve sıralı test uygulama stratejisinin uygulanması önceden diğer çalışmalardan elde edilen yeterli kanıtın olduğu maddelerin gözde aşınma/tahriş etkisiyle ilgili in vivo testlerin yapılmasına duyulan ihtiyacı azaltacaktır. Gözde aşınma veya tahriş potansiyelinin belirlenmesi in vivo dermal aşınma/tahriş çalışması uygulandıktan sonra bile sıralı test uygulama stratejisi kullanılarak belirlenemiyorsa, in vivo göz aşınma/tahriş testi yapılabilir.

Aşınma/tahriş için uygulanan geçerli ve kabul edilmiş in vitro veya ex vivo testlerin performansını içeren, tercih edilen sıralı bir test yapma stratejisi, bu yöntemde EK-I olarak yer almaktadır. Strateji geliştirilmiş ve OECD çalıştayı katılımcıları tarafından tavsiye edilmiştir(8), tavsiye edilen test yapma stratejisi olarak Kimyasal Maddelerin Sınıflandırılması için Küresel Uyumlaştırılmış Sistem (Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances, GHS) içinde uyarlanmıştır (9). Bu test stratejisinin in vivo teste başlamadan önce izlenmesi tavsiye edilir. Yeni maddeler için, maddenin aşınma/tahriş etkisiyle ilgili verilerin bilimsel anlamda güvenilirliği için adım adım test uygulama yaklaşımı tavsiye edilir. Dermal aşınma/tahriş verilerinin yetersiz olduğu, mevcut

maddeler için, verilerdeki boşlukların doldurulması için bu strateji kullanılabilir. Farklı test stratejilerinin ve prosedürlerinin kullanımı veya adım adım test uygulama yaklaşımını kullanma kararı gerekçelendirilmelidir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Göz tahrişi: test maddesinin gözün ön yüzeyine uygulanmasını takiben, gözde meydana gelen, 21 günlük uygulama için tamamen geri dönüşümlü olan değişiklikler

Göz aşınması: test maddesinin gözün ön yüzeyine uygulanmasını takiben, 21 günlük uygulama için tamamen geri dönüşümlü olmayan, gözde meydana gelen doku hasarı veya görmede ciddi fiziksel bozukluk.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Test edilen madde, deney hayvanının gözlerinden birine tek doz olarak uygulanır. Test maddesinin uygulanmadığı alanlar kontrol olarak düşünülür. Gözde tahriş/aşınma derecesi konjoktiva, kornea ve iristeki lezyonlar belli aralıklarla sayılarak değerlendirilir. Etkilerin tümüyle değerlendirilmesini sağlamak amacıyla gözdeki diğer etkiler ve sistemik olumsuz etkiler ayrıca tanımlanır. Çalışmanın süresi, gözlemlenen etkilerin tersinir olup olmadıklarının değerlendirilmesi için yeterli olmalıdır.

Testin herhangi bir aşamasında sürekli olarak ciddi acı ve/veya ağrı belirtileri gösteren hayvanlar insani olarak öldürülmeli ve madde tayin edilmelidir. Can çekişen ve ciddi acı çeken hayvanların insani bir şekilde öldürülmelerine karar verme kriterleri kaynak (10)'da yer almaktadır.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. In vivo test hazırlığı

1.4.1.1. Hayvan türlerinin seçimi
Albino tavşan tercih edilen laboratuvar hayvanıdır ve sağlıklı, genç, yetişkin tavşanlar kullanılır. Diğer türlerin kullanımında bir gerekçe sağlanmalıdır.

1.4.1.2. Hayvanların hazırlanması

Test başlamadan önce 24 saat içinde geçici olarak seçilen her bir deney hayvanının iki gözü de incelenmelidir. Göz tahrişi, oküler bozukluklar veya önceden var olan korneal hasar görülen hayvanlar kullanılmamalıdır.

1.4.1.3. Barınma ve beslenme koşulları

Hayvanlar ayrı ayrı barındırılmalıdır. Oda sıcaklığı tavşanlar için 20°C (± 3°C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranı en az %30 olmalı ve tercihen %70'i geçmemelidir, odanın temizlenmesi sırası dışında, amaç % 50–60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır. Beslenme için sınırsız içme suyu tüketimiyle beraber geleneksel laboratuvar yiyecekleri kullanılabilir.

1.4.2. Test protokolü

1.4.2.1. Test maddesinin uygulanması

Test maddesi alt göz kapağı yavaşça göz bebeğinden uzaklaştırılarak itildikten sonra her bir hayvanın bir gözünün konjunktival kesesine yerleştirilmelidir. Kapaklar daha sonra bir saniyeliğine bir araya getirilir ve madde kaybı önlenmiş olur. İşlem yapılmayan diğer göz kontrol olarak kullanılır.

1.4.2.2. Yıkama(İrigasyon)

Test hayvanlarının gözleri, katı maddeler ve ani aşındırıcı veya tahriş edici etkilerin görüldüğü durumlar haricinde test maddesinin uygulanmasını takiben en az 24 saat yıkanmamalıdır (bakınız bölüm 1.4.2.3.2). Uygun görülürse, 24. saatte yıkanabilir. Bilimsel bir gerekçe olmadıkça, yıkamanın etkisinin görülmesi için uydu hayvan grubunun kullanılması tavsiye edilmez. Eğer bir uydu gruba ihtiyaç duyulursa, iki tavşan kullanılmalıdır. Yıkama zamanı, yıkama çözeltisinin sıcaklığı ve bileşenleri, uygulama süresi, hacmi ve hızı gibi yıkama koşulları dikkatlice belgelenir.

1.4.2.3. Doz seviyeleri

1.4.2.3.1. Sıvıların test edilmesi

Sıvıların test edilmesi için 0,1 ml'lik bir doz kullanılır. Maddenin gözün içine doğrudan uygulanması için pompalı spreyler kullanılmamalıdır. Sıvı sprey göze 0,1 ml damlatmadan önce çıkarılmalı ve bir haznede toplanmalıdır.

1.4.2.3.2. Katıların test edilmesi

Katılar, macunlar ve parçalı maddeler test edilirken, kullanılan miktar 0.1 ml veya 100 mg'ı geçmeyecek şekilde olmalıdır. Test maddesi ince toz haline gelinceye kadar ezilmelidir. Örnek ölçme kabına hafifçe vurularak nazikçe sıkıştırıldıktan sonra katı maddenin hacmi ölçülmelidir. Eğer katı test maddesi test hayvanının gözünden, uygulamadan bir saat sonraki gözlem zamanında fizyolojik mekanizmalarla uzaklaştırılmamışsa, göz tuzlu su veya distile suyla silinebilir.

1.4.2.3.3. Aerosollerin test edilmesi

Bütün pompalı spreylerin ve aerosollerin göze damlatılmadan önce biriktirilmesi tavsiye edilir. Tek istisna, basınçlı aerosol kutularındaki maddeler içindir, çünkü buharlaşma nedeniyle madde toplanamaz. Böyle durumlarda göz açık tutulmalı ve test maddesi göze yaklaşık 1 saniye içinde gözün önünden 10 cm uzaklıktan doğrudan damlatılır. Bu uzaklık sprey basıncına ve içeriğine bağlı olarak değişir. Gözün sprey basıncıyla zarar görmemesine dikkat edilmelidir. Uygun durumlarda spreyin gücünden dolayı gözde 'mekanik' hasar potansiyelinin değerlendirilmesine ihtiyaç olabilir. Aerosol dozunu tahmin etmek için aşağıdaki gibi bir benzetme yapılır: madde tavşan gözü büyüklüğündeki ve kâğıdın doğrudan önünde bulunan açıklıktan tartma kâğıdına sprey gibi sıkılır. Kâğıdın ağırlığındaki artış göze spreylenen miktarı tahmin etmek için kullanılır. Uçucu maddeler için doz, test maddesi uzaklaştırılmadan önce uzaklaştırıldıktan sonra toplayıcı hazne tartılarak tahmin edilebilir.

1.4.2.4. Başlangıç testi (Bir hayvan kullanılan in vivo gözde tahriş/aşınma testi)

Sıralı test uygulama stratejisinde açıkça belirtildiği gibi (bakınız Ek-I), başlangıç olarak bir hayvanın kullanıldığı in vivo testin uygulanması kesinlikle tavsiye edilir. Bu testin, tanımlanan prosedür uygulanarak elde edilen sonuçları, maddenin gözde aşındırıcı veya ciddi tahriş edici olduğunu gösteriyorsa, oküler tahriş için ilave bir test uygulanmasına gerek yoktur.

1.4.2.5. Lokal anestezikler

Lokal anestezikler duruma bağlı olarak kullanılabilir. Delilin ispat kuvveti analizi maddenin acı verme potansiyeli olduğuna işaret eder veya başlangıç testi ağrı veren bir tepkimenin olacağını gösterirse, test maddesi damlatılmadan önce lokal anestezik kullanılmalıdır. Test maddesine karşı gelişen tepkimeler arasındaki farklılığın onun kullanımına bağlı olmadığını ispatlamak için lokal anesteziğin tipi, konsantrasyonu ve dozu dikkatlice seçilmelidir. Kontrol göze de benzer şekilde anestezi yapılmalıdır.

1.4.2.6. Teyit testi (İlave hayvan kullanılan in vivo gözde tahriş testi)

Eğer başlangıç testinde aşındırıcı etki gözlenmezse, tahriş edici veya negatif cevap ilave iki hayvan daha kullanılarak teyit edilmelidir. Eğer başlangıç testinde ciddi bir tahriş edici etki gözlenirse, teyit testinde olası güçlü (tersinmez) bir etkiyi işaret ediyorsa, teyit testinin aynı anda iki ilave hayvanın maruz bırakılarak uygulanmasındansa sıralı şekilde bir zamanda bir hayvana uygulanması tavsiye edilir. Eğer ikinci hayvan aşındırıcı veya ciddi tahriş edici etki gösterirse, teste devam edilmez. Zayıf veya orta dereceli tahriş edici cevapları teyit etmek için ilave hayvana ihtiyaç duyulabilir.

1.4.2.7. Gözlem süresi

Gözlem süresinin uzunluğu, gözlenen etkilerin şiddetinin ve tamamen geri dönüşümlü olup olmadığının anlaşılması için yeterli olmalıdır. Hayvanların ciddi acı ve ağrı belirtileri göstermeye devem etmesi halinde deneye son verilmelidir (9). Etkilerin tersinirliğinin belirlenmesi için, hayvanlar normalde test maddesi uygulandıktan sonra 21 gün boyunca gözlenmelidir. Eğer 21 günden önce tersinirlik görülürse, deneye o anda son verilmelidir.

1.4.2.7.1. Klinik gözlemler ve göz tepkimelerinin derecelendirilmesi

Gözler test maddesi uygulandıktan sonra 1., 24., 48. ve 72. saatlerde incelenmelidir. Hayvanlar gerekli bilgi edinildikten sonra teste devam ettirilmemelidir. Ciddi acı ve ağrı çeken hayvanlar vakit kaybetmeden insani koşullarda öldürülmeli, madde buna göre değerlendirilmelidir. Aşağıdaki göz lezyonlarını gösteren hayvanlar insani şekilde öldürülmelidir:
- korneal perforasyon (kornea delinmesi) veya stafiloma gibi anlamlı kornea ülseri;
-gözün ön odacığında kanlanma;
-48 saat kalıcı, 4. derece korneal opaklık;
-72 saat kalıcı, ışık refleksi yokluğu (2nci derece iridial (irisle ilgili) cevap) konjunktival membran ülseri, konjunktivada veya 3ncü göz kapağında nekroz veya deri dökülmesi. Bu durum böyle lezyonların genelde tersinir olmamasına bağlıdır.

Oküler lezyonların görülmediği hayvanlar damlatmadan sonra 3 günden erken olmamak kaydıyla deneyden alınabilir. Hafiften orta şiddete doğru lezyonları olan hayvanlar lezyonlar netleşinceye kadar veya testin sonuçlandırıldığı 21 gün boyunca gözlenmelidirler. Doku bozukluklarının durumu ve geri dönüşümlü olup olmadığının belirlenmesi için 7, 14 ve 21nci günlerde gözlem yapılmalıdır.

Oküler tepkimelerin dereceleri (konjunktiva, kornea ve iris) her incelemede kaydedilmelidir. (Tablo I). Gözdeki diğer herhangi bir lezyon (ör. pannus, lekelenme) veya sistemik olumsuz etkiler de ayrıca rapor edilmelidir.

Tepkimelerin incelenmesi binoküler (dürbün için) büyüteç, el slit-lambası (ince dar el lambası), biyomikroskop veya diğer uygun aletin kullanımıyla kolaylaştırılabilir. 24. saatlerdeki gözlemler kaydedildikten sonra, gözler floresein yardımıyla tekrar incelenebilir.

Gözdeki cevapların derecelendirilmesi ister istemez özneldir. Gözdeki derecelendirmelerin düzenlenmesini teşvik etmek ve gözlemlerin yorumlanmasını da içine alan test uygulama laboratuvarlarına yardımcı olmak için, gözlemleri yapan personelin kullanılan skorlama sistemi konusunda yeterli eğitimden geçmesi gerekir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Oküler tahriş skorları lezyonların doğası ve ciddiyetiyle, tersinir olup olmamalarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Skorlar ayrı ayrı, materyalin tahriş edici özelliğiyle ilgili olarak mutlak bir standardı ifade etmezler; bunun yanında test materyalinin diğer özellikleri de ayrıca değerlendirilir. Bunun yerine, her bir skor, çalışmadan elde edilen diğer tüm gözlemlerle beraber değerlendirilmesi gereken referans değerleri olarak sunulmalıdır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- in vivo test yapma gerekçesi: sıralı test uygulama strateji sonuçlarını da içeren önceden mevcut test verilerinin delilin ispat kuvveti analizi:
- testten önce elde edilen mevcut verilerle ilgili tanımları;
- test uygulama stratejisinin her aşamasından elde edilen verileri;
- uygulanan protokollerin detayları, test/referans madde ile elde edilen sonuçları içeren in vitro testlerin tanımları;
- uygulanan in vivo dermal aşınma/tahriş çalışmasının tanımı ve elde edilen sonuçları;
- in vivo çalışma yürütmek için delilin ispat kuvveti analizi

Test maddesi:

- kimlik verileri (ör., CAS sayısı; kaynak; saflık; bilinen safsızlıklar; lot sayısı);

- fiziksel doğası ve fizikokimyasal özellikleri (ör. pH, uçuculuk, çözünürlük, kararlılık, suyla tepkime verebilirlikleri);
- eğer karışımsa, kompozisyon ve bileşenlerin bağıl yüzdeleri.
- eğer lokal anestezik kullanılmışsa, tanımlanması, saflığı, tipi, dozu ve test maddesiyle potansiyel etkileşimi

Taşıyıcı:
- tanımlanması, konsantrasyon (nerede uygunsa), kullanılan hacim;
- taşıyıcı seçimi için gerekçe

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk, albino tavşan dışında hayvan kullanımı için gerekçe;
- testin başlangıcındaki her iki cinsiyete ait hayvan sayısı (eğer gerekliyse);
- test ve kontrol gruplarındaki her iki cinsiyetteki hayvan sayısı (gerekliyse)
- testin başında ve sonunda ayrı ayrı hayvan ağırlıkları;
- hayvanların kaynakları, barınma koşulları, diyet, vs.

Sonuçlar:
- her bir gözlem zamanındaki tahrişi skorlamak için kullanılan yöntemin tarifi (ör. el slit lambası, biyomikroskop, floresein);
- her bir hayvan için her bir gözlem zamanındaki tahriş/aşınma cevap verilerinin tablosu;
- gözlenen tahriş veya aşınmanın doğasını ve derecesini anlatan tanım;
- gözde gözlenen tüm lezyonların tanımlanması (ör., damarlanma, pannus oluşumu, adezyonlar, lekelenme);
- oküler olmayan lokal ve sistematik olumsuz etkilerin tanımlanması ve histopatolojik bulgular, eğer varsa,

Sonuçların tartışılması.

3.2. Sonuçların yorumlanması

Laboratuar hayvanlarındaki gözde tahriş çalışmalarının insana uyarlanması sadece sınırlı bir dereceye kadar geçerlidir. Pek çok durumda albino tavşanlar oküler aşındırıcı ve tahriş edicilere insanlardan daha hassastırlar. Veriler yorumlanırken, ikincil bir enfeksiyona bağlı tahrişin dahil edilmemesine dikkat edilmelidir.

4. KAYNAKLAR

(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., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. InVitro, 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) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

(7) Testing method B.4. Acute toxicity: dermal irritation/corrosion.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on 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).

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ ehs/Class/HCL6.htm).

(10) 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).

TABLO I: OKÜLER DOKU BOZUKLUKLARININ (LEZYONLARIN) DERECELENDİRİLMESİ

Kornea

Opaklık: yoğunluk derecesi (okumalar en yoğun alandan alınmalıdır) (*)

Ülser veya opaklık yok	0
Dağınık veya yaygın alanlarda opaklık (normal parlaklığın hafif donukluğu dışında); iristeki detaylar açıkça görülebilir	1
Kolaylıkla ayırt edilebilir yarısaydam alan; iristeki detaylar hafifçe anlaşılır	2
Hücre ölümü olan alan, irisle ilgili detaylar görünür değildir; pupil büyüklüğü çok zor ayırt edilebilir	3
Opak kornea; opaklık yüzünden iris ayırt edilemez.	4

Maksimum olasılık: 4

(*) Kornea opaklık alanı not edilmelidir.

İris

Normal	0
Belirgin şekilde derinleşen büzgüler, tıkanıklık, şişme, orta şiddette sirkumkorneal (kornea küresi) hiperemi; veya kanama; ışığa duyarlı iris (etki olabileceği düşünülen yavaş tepkime	1
Hemoraj, büyük hasar veya ışığa duyarsızlık	2

Maksimum olasılık: 2

Konjonktiva

Kızarıklık (kornea ve iris hariç, palpebral ve bulbar konjonktivaya dair);

Normal	0
Biraz hiperemik kan damarları (kanama)	1
Yaygın, koyu vişne rengi; damarlar ayrı ayrı kolayca ayırt edilemez	2
Yaygın güçlü kızarıklık	3

Maksimum olasılık: 3

Kemozis

Şişme (göz kapakları ve/veya 3. göz kapağı)

Normal	0
Normalin biraz üzerinde şişlik	1
Belirgin şişlik, kapakların kısmen ters dönmesi	2
Şişlik, yarı kapalı göz kapakları	3
Şişlik, yarıdan daha fazla kapalı göz kapakları	4

Maksimum olasılık: 4

Ek-I

Gözde Tahriş ve Aşınma için Sıralı Test Uygulama Stratejisi

Genel açıklamalar

Gerek güvenilir bilim ve gerekse hayvan refahı açısından, hayvanların gereksiz kullanımından kaçınmak ve hayvanlarda ciddi tepkiler meydana getiren testleri azaltmak önemlidir. Bir maddenin potansiyel olarak oküler aşındırma/tahriş etme potansiyeline ilişkin tüm bilgiler in vivo testler üzerine düşünülmeden önce değerlendirilmelidir. Bir maddenin dermal aşınma veya tahriş oluşturma potansiyelini sınıflandırmak için önceden elde edilmiş yeterli bilgi olabilir ve test hayvanları üzerinde deney yapılmasına gerek kalmayabilir. Bu yüzden, delilin ispat kuvveti analizi ve sıralı test uygulama stratejisi in vivo testlere olan ihtiyacı, özellikle de madde ciddi tepkimeler meydana getirecek gibiyse, en aza indirecektir.

Maddenin gözü tahriş etme/aşındırma potansiyeli olup olmadığı hakkında karar vermek için mevcut bilgiler değerlendirilirken, in vivo göz çalışmaları haricinde ilave çalışmalar yürütülüp yürütülmeyeceğini belirlemek için delillerin ispat kuvveti analizi kullanılması tavsiye edilir. İlave çalışmaların gerekli olduğu durumlarda, ilgili verilerin oluşturulması için sıralı test uygulama stratejisinin kullanılması tavsiye edilir. Daha önce teste tabi tutulmamış kimyasalların gözde aşınma/tahriş potansiyelinin değerlendirmesinde kullanılacak verilerin geliştirilmesi için sıralı test uygulama stratejisi kullanılmalıdır. Bu Ekte tarif edilen test uygulama stratejisi OECD çalıştayında geliştirilmiştir (1) ve daha sonra onaylanarak Kimyasal Maddelerin İnsan Sağlığı ve Çevreye Etkileri için Uyumlu Hale Getirilmiş Bütünleştirilmiş Tehlike Sınıflandırma Sistemi içinde genişletilmiş, Kasım 1998'de 28. Kimyasallar Komitesi Ortak Toplantısı ve Kimyasallar Üzerine Çalışma Grubu Toplantı'sında kabul edilmiştir(2).

Her ne kadar bu sıralı test uygulama stratejisi, test yöntemi B.5'in bütününü oluşturmuyorsa da gözdeki tahriş/aşınma özelliğinin belirlenmesi için tavsiye edilen yaklaşımı ifade eder. Bu yaklaşım, gözde tahriş/aşınma in vivo testlerinin uygulanması için hem en iyi uygulama hem de etik bir değerlendirmedir. Test uygulama yöntemi, in vivo testlerin yürütülmesi için bir rehber sağlar ve böyle bir teste başlamadan önce vurgulanması gereken etkenleri özetler. Sıralı test uygulama stratejisi, test maddesinin gözü tahriş etme/aşındırma özelliklerinin mevcut verilerle değerlendirilmesi için bir delilin ispat kuvveti analiz yaklaşımı ve ilave çalışmaya ihtiyaç duyulan veya hiçbir çalışma yapılmamış maddelerle ilgili verilerin oluşturulması için de katlı bir yaklaşım sunar. Strateji, özel koşullar altında önce geçerli ve kabul edilmiş in vitro veya ex vivo testlerin sonra da B.4 cilt aşınma/tahriş çalışmaları test yönteminin uygulanmasını içerir (3)(4).

Test uygulama stratejisinin tanımı ve değerlendirmesi

Testleri sıralı test uygulama stratejisinin (Şekil) bir kısmı olarak yürütmeye başlamadan önce, in vivo göz testlerine ihtiyaç olup olmadığının belirlenmesi için mevcut tüm bilgiler değerlendirilmelidir. Her ne kadar anlamlı bilgi tek bir parametrenin (Örnek olarak; uç pH değerleri) değerlendirilmesiyle elde edilebilse de mevcut bilgilerin tamamı göz önünde bulundurulmalıdır. Şüpheli maddenin veya yapısal benzerlerinin etkileriyle ilgili tüm veriler, delilin ispat kuvveti kararı verilerek ve bu karar için bir gerekçe sunularak değerlendirilmelidir. Maddeye dair elde mevcut olan insan ve hayvan verilerine öncelikli olarak önem verilmelidir bunu da in vitro ve ex vivo testlerden elde edilen veriler

izlemelidir.Aşındırıcı maddelere ait in vivo çalışmalardan mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. Test uygulama stratejisinde göz önünde bulundurulması gereken faktörler aşağıdaki gibidir:

(1. Basamak) İnsan ve hayvana ait var olan verilerin değerlendirilmesi. İnsanla ilgili mevcut veriler ör. Klinik veya mesleksel çalışmalar ve vaka raporları ve/veya tek veya tekrarlı oküler maruz kalma toksisite çalışmalarından elde edilen hayvan test verileri, göz önünde bulundurulmalıdır, çünkü bu şekilde göz üzerindeki etkilerle doğrudan ilgili bilgi sağlanır. Daha sonra insan ve/veya hayvan çalışmalarından elde edilen dermal tahriş/aşınma varlığını gösteren sonuçlar değerlendirilmelidir. Gözde aşındırıcılığı ve ciddi tahriş özelliği bilinen maddeler hayvanların gözüne damlatılmamalıdır, aynı şekilde ciltte aşındırıcı veya tahriş edici etki gösteren maddeler, gözde de aşındırıcı/tahriş edici etki meydana getireceğinin göz önünde bulundurulması gerektiğinden, göze uygulanmamalıdır. Önceden yapılan çalışmalardan gözde aşındırıcılığı ve tahriş özelliklerinin olmadığına dair yeterli delilin bulunduğu maddelerin in vivo göz çalışmalarında test edilmesine gerek yoktur.

(2.Basamak) Yapı aktivite ilişkisinin analizi (SAR). Yapısal olarak birbirleriyle ilişkili maddelere uygulanan testlerin sonuçları, mevcutsa, göz önüne alınmalıdır. Yapısal olarak ilişkili maddelerle veya karışımlarla ilgili olarak gözdeki aşındırıcı/tahriş edici potansiyellerine dair elde yeterli insan ve/veya hayvan verileri mevcutsa, değerlendirilmekte olan maddenin aynı tepkileri meydana getireceği tahmin edilebilir. Böyle durumlarda, maddesinin teste tabi tutulmasına gerek yoktur. Yapısal olarak ilişkili maddelerle veya böyle maddelerin karışımlarından elde edilen negatif veriler, sıralı test uygulama stratejisi altındaki bir maddenin tahriş edici ve aşındırıcı olmadığına karar vermek için yeterli değildir. Maddenin hem dermal hemde oküler aşındırma ve tahriş potansiyelini belirlemek için geçerli ve kabul edilmiş SAR yaklaşımları kullanılmalıdır.

(3.Basamak) Fizikokimyasal özellikler ve kimyasal reaktivite. pH değeri ≤ 2.0 veya ≥ 11.5 olan maddeler kuvvetli bölgesel etkiler gösterebilirler. Eğer kuvvetli pH değeri bir maddenin ciltte aşındırıcı olup olmadığını belirlemek için temel alınıyorsa, o zaman maddenin asit/alkali rezervi de (tampon kapasitesi) ayrıca dikkate alınmalıdır (5)(6). Tampon kapasitesine göre maddenin göz üzerinde aşındırıcı etkisi olmayabileceği düşünülüyorsa, bunu teyit etmek için ilave testler -tercihen geçerli ve kabul edilmiş in vitro veya ex vivo (canlı sistemin laboratuvar ortamında incelendiği sistem)- yürütülmelidir. (bakınız 5. ve 6. basamaklar).

(4.Basamak) Diğer mevcut bilgilerin ele alınması. Dermal yolla sistemik toksikoloji hakkında elde edilen tüm bilgiler bu basamakta değerlendirilmemelidir. Test maddesinin akut dermal toksisitesinin ayrıca üzerinde durulmalıdır. Eğer test maddesinin dermal yolla çok toksik olduğu gösterilirse, gözde test edilmesine gerek kalmayabilir. Her ne kadar akut dermal toksisite ve dermal aşınma/tahriş arasında geçerli bir ilgi yoksa da eğer bir madde dermal yolla çok toksikse, göze uygulandığında çok fazla toksisite göstereceği öngörülebilir. Bu gibi veriler 2. ve 3.basamaklar arasında da göz önünde bulundurulmalıdır.

(5. veya 6.Basamaklar) in vitro veya ex vivo testlerin sonuçları. Özellikle göz veya cildi aşındırma ve tahriş etme gibi özel etkilerin değerlendirilmesi için tasarlanan geçerli ve kabul edilmiş in vivo veya ex vivo testlerde (7)(8) aşındırıcı veya ciddi tahriş özelliği gösteren maddelerin hayvanlarda denenmesine gerek yoktur. Böyle maddelerin, benzer ciddi etkileri in vivo olarak da göstereceği önceden tahmin edilebilir. Eğer geçerli ve kabul edilmiş in vitro/ex vivo testler mevcut değilse, 5. ve 6. basamaklar geçilerek doğrudan 7. basamağa geçilir.

(7. Basamak) Maddenin in vivo dermal tahriş ediciliğinin ve aşındırıcılığının değerlendirilmesi. Bir maddenin yukarıda listelenen çalışmalardan elde edilen verilere dayanan potansiyel aşındırma/tahriş etme durumuyla ilgili delilin ispat kuvveti analizi yapıldığında elde yeterli bilgi olmadığı zaman test yöntemi B.4 ve ilişiğindeki Ek(9) kullanılarak in vivo cilt tahriş/aşınma potansiyeli ilk önce değerlendirilmelidir. Eğer maddenin aşındırıcı ciltte ciddi tahriş edici olduğu gösterilirse, diğer bilgiler başka bir sonucu desteklemediği sürece, maddenin aşındırıcı göz tahriş edici olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Böylece, in vivo göz testinin uygulanmasına gerek duyulmayacaktır. Eğer madde ciltte aşındırıcı veya ciddi tahriş edici değilse, in vivo göz testi yapılmalıdır.

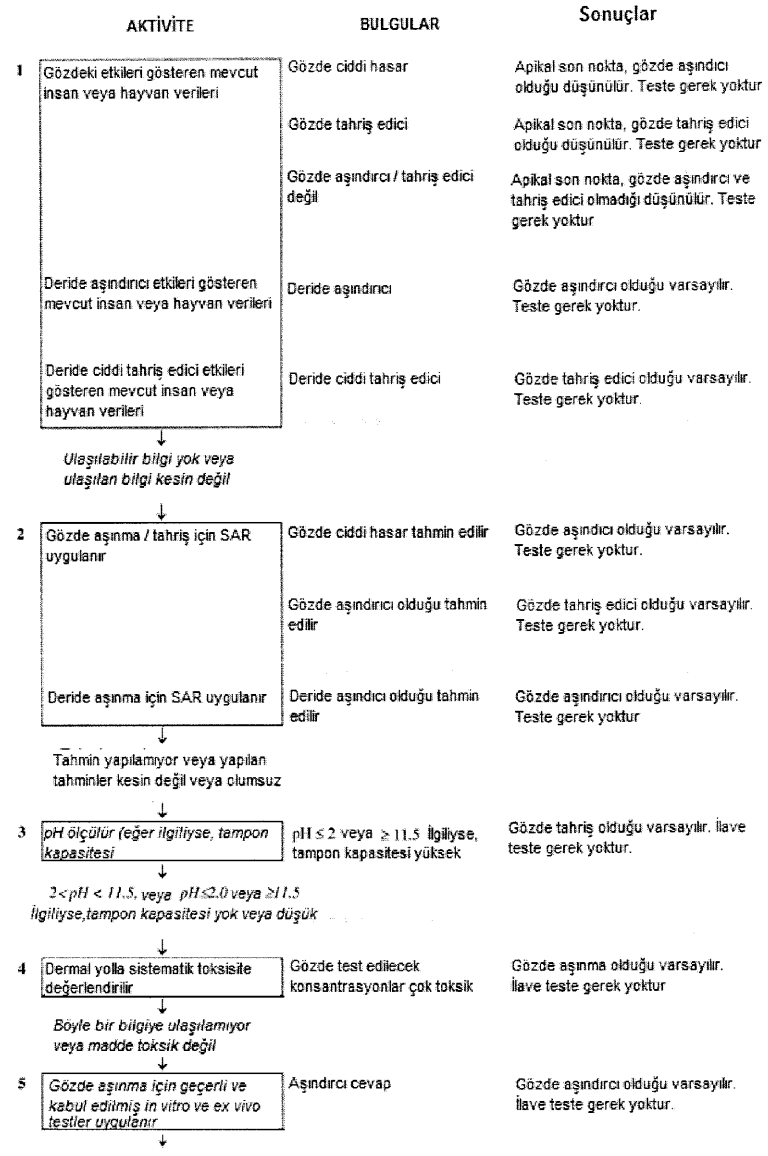
Tavşanlardaki in vivo test (8. ve 9. Basamaklar). In vivo oküler test uygulamasına bir hayvan kullanılarak başlangıç testi ile başlanmalıdır. Eğer bu testin sonuçları maddenin göz üzerinde ciddi tahriş edici veya aşındırıcı olduğunu gösterirse, ilave testlere gerek yoktur. Eğer başlangıç testinde herhangi bir aşındırıcı veya ciddi tahriş etkisi gözlenmezse iki ilave hayvan kullanılarak teyit testi yürütülmelidir.

KAYNAKLAR

(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://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 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).
(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161- 177.
(4) Testing method B.4. Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion.
(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (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) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
(9) Annex to Testing method B.4: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.

GÖZDE TAHRİŞ VE AŞINMA İÇİN TEST UYGULAMA VE DEĞERLENDİRME STRATEJİLERİ

ŞEKİL



Madde aşındırıcı değil veya gözde aşınma için geçerli in vitro ve ex vivo testler henüz mevcut değil

↓

6	*Gözde tahriş için geçerli ve kabul edilmiş in vitro ve ex vivo testler uygulanır*	Tahriş edici cevap	Gözde tahriş olduğu varsayılır. İlave teste gerek yoktur

↓

Madde tahriş edici değil veya gözde tahriş için geçerli in vitro ve ex vivo testler henüz mevcut değil

↓

7	*İn vivo deri tahriş etme/aşındırma potansiyali deneysel olarak değerlendirilir.(Bakınız Ekiyle birlikte test yöntemi B.4)*	Aşındırıcı ve tahriş edici cevap	Gözde aşınma olduğu varsayılır. İlave teste gerek yoktur

↓

Madde deride aşındırıcı veya şiddetli tahriş edici değil

↓

8	Bir hayvan kullanılarak başlangıç in vivo tavşan göz testi uygulanır	Gözlerde ciddi hasr	Gözde aşındırıcı olduğu varsayılır. İlave teste gerek yoktur

↓

Ciddi hasar yok veya cevap yok

↓

9	Bir veya iki hayvan kullanılarak doğrulama testi uygulanır	Aşındırıcı ve tahriş edici	Gözde aşındırıcı veya tahriş edici olduğu düşünülür. İlave teste gerek yoktur
		Aşındırıcı ve tahriş edici değil	Gözde aşındırıcı veya tahriş edici olmadığı düşünülür. İlave teste gerek yoktur

B.6 CİLT HASSASİYETİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Açıklamalar:
Testlerin duyarlılığının ve gerçekleştirilebilirliğinin, halk sağlığıyla ilgili zehirlenme için bir sınıflandırma sisteminde, insandaki potansiyel cilt duyarlılığını belirlemede önemli olduğu düşünülür.

İnsan cildini hassaslaştırma potansiyeli olan tüm maddeleri belirleyebilmek için ve tüm maddeler için uygun olan, tek bir test yöntemi yoktur.

Deriden nüfuz etme yeteneği dahil, bir maddenin fiziksel özellikleri gibi faktörler, bir testin seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır.

Kobay kullanılarak geliştirilen iki tip yöntem vardır: alerjik(özel bir duruma karşı aşırı duyarlılık) durumun test maddesinin Freund Tam Adjuvanı (Freunds Complete Adjuvant-FCA) içinde çözündüğü veya askıda kaldığı adjuvan-tip(iyileşme şansını artırmak için birincil tedaviden sonra uygulana yardımcı tedavi) testler ve adjuvan olmayan testler.

Adjuvan-tip testler, bir maddenin insan cildinde olası hassaslaştırıcı etkisini belirlemek için, Freund Tam Adjuvanı uygulanmayanlardan daha hassas olduğundan tercih edilen yöntemlerdir.

Kobay (guine pig) Maksimizasyon Testi (Guinea-Pig Maximisation Test-GPMT) yaygın olarak kullanılan adjuvan-türü bir testtir. Bir maddenin cilt duyarlılığı reaksiyonuna neden olma potansiyelini belirlemek için, başka yöntemler kullanılabiliyorsa da GPMT'nin adjuvan tekniği olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Pek çok kimyasal sınıfla birlikte, adjuvan-olmayan testlerin (tercih edilenlerden biri de Buehler testidir) hassaslaştırıcılığının daha az olduğu düşünülür.

Belli durumlarda Buehler testini seçmek için, Kobay Maksimizasyon Testinde uygulandığı şekliyle deri altı enjeksiyonundan ziyade, güncel uygulamanın kullanılıyor olması gibi iyi nedenler olabilir. Buehler testi kullanıldığında bilimsel bir gerekçe sunulmalıdır.

Bu yöntemde Kobay Maksimizasyon Testi (GPMT) ve Buehler testi anlatılmıştır. Geçerli olduğu ve bilimsel gerekçeler sunulduğu sürece, diğer yöntemler de kullanılabilir.

Belirli bir tarama testinde pozitif sonuca rastlanmışsa, test maddesi potansiyel bir hassaslaştırıcı olarak düşünülebilir ve ek bir kobay testi yapılmasına gerek olmayabilir. Ancak, böyle bir testte negatif sonuç görülürse, bu yöntemde anlatıldığı şekilde bir kobay testi yürütülmelidir.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Cilt hassasiyeti: (allerjik temas deri iltihabı (dermatitis)) Bir maddeye karşı gelişen immünolojik (bağışıklık sistemine özgü) cilt reaksiyonudur. İnsanda cevaplar, kaşınma, ciltte kızarıklık, ödem, ciltte kabarma ve kistler, deride su toplanması veya bunların birleşimleriyle bulunabilir. Başka türlerde reaksiyonlar değişebilir, sadece ciltte kızarıklık ve ödem görülebilir.

Başlatma maruz kalması: Aşırı hassaslaştırıcı bir durumu meydana getirmesi amacıyla bir nesnenin test maddesine deneysel maruz kalması.

Başlatma süresi: Aşırı duyarlı bir durumun gelişebileceği başlatma maruz kalmasını izleyen en az bir haftalık süre.

Sataşma (challange) maruz kalması : Başlatma süresini takiben daha önceden test maddesiyle karşılaşmış bir nesnenin aşırı hassaslaştırıcı bir reaksiyon verip vermediğinin belirlendiği deneysel maruz kalma.

1.3. Referans maddeler

Kullanılan deneysel tekniğin duyarlılığı ve güvenilirliği, her altı ayda bir hafiften-ortaya doğru şiddetli cilt hassasiyeti yaratan özelliği olduğu bilinen maddelerin kullanımıyla değerlendirilir.

Uygun şekilde yürütülen bir testte, hafif-orta şiddette hassasiyet geliştiriciler için bir adjuvan testte en az %30'luk,bir non-adjuvan testinde en az % 15'lik cevap beklenir.

Referans madde olarak aşağıdaki maddeler tercih edilir.

CAS numaraları	EINECS numaraları	EINECS isimleri	Yaygın isimleri
101-86-0	202-983-3	α-hekzilsinnamaldehit	α-hekzilsinnamaldehit
149-30-4	205-736-8	Benzotiyazol-2-tiyol (merkaptobenzotiyazol)	kaptaks
94-09-7	202-303-5	benzokain	norkain

Uygun bir gerekçenin sunulduğu, yukarıdaki kriterlere uyan başka kontrol maddelerinin kullanıldığı durumlar da olabilir

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test hayvanları başlangıçta test maddesine deri altı enjeksiyonlarla ve/veya üst deriye ait uygulamalarla maruz kalırlar (başlatma maruz kalması). İmmün cevabın gelişebileceği 10-14 günlük bir test süresini takiben (indüksiyon süresi), hayvanlar sataşma dozuna maruz kalırlar. Sataşma dozuna maruz kalan test hayvanlarındaki cilt reaksiyonunun büyüklüğü ve derecesi, başlatma ve sataşma maruz kalması sırasında yalandan muameleye tabi tutulan kontrol hayvanlarınkiyle karşılaştırılır.

1.5. Test yöntemlerinin tanımlanması

Test maddesinin uzaklaştırılmasının gerekli olduğu düşünülüyorsa, su ya da uygun çözücü kullanılarak mevcut cevap değiştirilmeden veya üst derinin (epidermis) bütünlüğü bozulmadan, bu durumun üstesinden gelinebilir.

1.5.1. Kobay Maksimizasyon Testi (GPMT)

1.5.1.1. Hazırlıklar

Sağlıklı, genç, yetişkin albino (deride melanin pigmentinin sentezlenememesiyle ortaya çıkan hastalık) kobaylar, testten en az beş gün öncesinden laboratuvar koşullarına alıştırılırlar. Testten önce hayvanlar rastgele ayrılır ve uygulama grupları oluşturulur. Tüylerin kırpılarak, tıraşlanarak veya kimyasal tüy dökücülerle uzaklaştırılması, kullanılan test yöntemine bağlıdır. Cilde zarar vermemeye dikkat edilmelidir. Hayvanlar test başlamadan önce ve testin sonunda tartılırlar.

1.5.1.2. Test koşulları

1.5.1.2.1. Test hayvanları

Albino kobayların laboratuvarda yaygın olarak kullanılan suşları tercih edilir.

1.5.1.2.2. Sayı ve cinsiyet

Erkek ve/veya dişi hayvanlar kullanılabilir. Dişiler kullanılıyorsa doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir.

Uygulama grubu olarak en az 10, kontrol grubu olarak da en az 5 hayvan kullanılır. 20'den az deney grubu ve 10'dan az kontrol grubu kobay kullanıldığında, test maddesinin hassaslaştırıcı olduğunu söylemek mümkün değildir. En az 20 test ve 10 kontrol hayvanının kullanıldığı ek testlerin yapılması şiddetle tavsiye edilir.

1.5.1.2.3. Doz seviyeleri

Kullanılan test maddesinin derişimi her bir başlatma maruz kalması için sistematik olarak iyi tolere edilmeli ve hafif-orta şiddette cilt tahrişi gösterecek en yüksek derişim olmalıdır. Sataşma maruz kalması için kullanılan derişim tahriş etmeyen en yüksek doz olmalıdır. Başka mevcut bilgi yoksa uygun derişimler iki veya üç hayvanın kullanıldığı pilot bir çalışmayla belirlenmelidir. Bu amaçla FCA ile muamele edilmiş hayvanların kullanımına önem verilmelidir.

1.5.1.3. İşlem

1.5.1.3.1. Başlatma

0. Gün –Uygulama grubu
0,1 ml hacimli deri altı enjeksiyonlar, üç çift olarak tüylerden temizlenmiş omuz bölgesine uygulanırlar, böylece her çiftten biri orta çizginin her iki yanında da bulunur.

1. Enjeksiyon : 1:1 (v/v) FCA/su veya fizyolojik tuzlu su çözeltisi karışımı
2. Enjeksiyon : uygun bir taşıyıcı içindeki seçilen derişimde test maddesi
3.Enjeksiyon : seçilen derişimde test maddesi formülasyonu, 1:1 (v/v) FCA/ su veya fizyolojik tuzlu su çözeltisi karışımı

Üçüncü enjeksiyonda, suda çözünen maddeler FCA ile karıştırmadan önce sulu fazda çözünürler. Yağda çözünen veya çözünmeyen maddeler, sulu fazla birleştirmeden önce FCA'nın içinde askıda kalırlar. Test maddesinin son derişimi 2. enjeksiyonda kullanılana eşit olur.

1. ve 2. Enjeksiyonlar birbirlerine yakın ve kafanın çok yakınında olacak şekilde uygulanırken, 3.enjeksiyon test alanının kuyruk kısmı boyunca uygulanır.

0.Gün kontrol grubu

0.1 ml hacimli deri-altı enjeksiyonlar üç çift olarak aynı yere uygulama hayvanlarında olduğu gibi uygulanırlar.
1. Enjeksiyon : 1:1 (v/v) FCA/ su veya fizyolojik tuzlu su çözeltisi karışımı (v/v)
2. Enjeksiyon: seyreltilmemiş taşıyıcı
3. Enjeksiyon: 1:1 (v/v) FCA/ su veya fizyolojik tuzlu su çözeltisi içinde 50% w/v formülasyonlu taşıyıcı karışımı

5-7. günler - uygulama ve kontrol grupları
Yüzeysel başlatma uygulamasından yaklaşık 24 saat önce, eğer madde bir cilt tahrişine neden olmuyorsa, kırpma ve/veya traşlama yapıldıktan sonra test alanına bölgesel tahriş oluşturmak için 0.5 ml % 10'luk vazelin içindeki sodyum lauril sülfat uygulanır.

6-8. günler - uygulama grubu
Test alanı tüylerden tekrar arındırılır. Bir filtre kâğıdı (2 x 4 cm) uygun bir taşıyıcı içinde test maddesiyle tamamen yüklenir ve test alanına uygulanır ve kapayıcı bir sargı ile 48 saat temas ettirilir. Taşıyıcı seçimi gerekçelendirilmelidir. Katılar, ince toz haline gelinceye kadar ezilir ve uygun bir taşıyıcı ile karıştırılır. Sıvılar, uygunsa, seyreltilmemiş olarak uygulanırlar.

6-8. günler - kontrol grubu
Test alanı tüylerden tekrar arındırılır. Sadece taşıyıcı, benzer şekilde test alanına uygulanır ve kapayıcı bir sargı ile 48 saat temas ettirilir.

1.5.1.3.2. Sataşma

20-22. Gün - uygulama ve kontrol grupları

Uygulamave kontrol grubundaki hayvanların böğürleri tüylerden temizlenir. Test maddesi yüklenmiş bir yama veya bölme hayvanın böğrüne uygulanır ve gerekli olduğunda sadece taşıyıcı yüklenmiş bir yama veya bölme diğer böğüre de ayrıca uygulanabilir. Yamalar kapayıcı bir sargı ile 24 saat temas ettirilir.

1.5.1.3.3 Gözlem ve Derecelendirme: uygulama ve kontrol grupları
– yamayı kaldırdıktan yaklaşık 21 saat sonra, sataşma alanı temizlenir ve adım adım kırpılır ve/veya traşlanır ve gerekiyorsa tüyleri alınır;

– yaklaşık 3 saat sonra (sataşma uygulamasının başlamasından yaklaşık 48 saat sonra) cilt reaksiyonu gözetlenir ve ekte gösterilen derecelendirmeye göre kaydedilir;– Bu gözlemden yaklaşık 24 saat sonra, ikinci bir gözlem (72 saat) yapılır ve tekrar kaydedilir.

Test ve kontrol hayvanlarının kör okumaları teşvik edilir.

İlk sataşmadan elde edilen sonuçları netleştirmek gerekirse, ilkinden yaklaşık bir hafta sonra uygun yerlerde yeni kontrol grubuyla ikinci bir sataşma (örn. tekrar sataşma) üzerinde düşünülmelidir. Bir tekrar sataşma (dozun artırılması) ayrıca orjinal kontrol grubunda da uygulanabilir.

Başlatma ve sataşma işlemlerinden kaynaklanan bütün cilt reaksiyonları ve sistemik reaksiyonları içine alan olağandışı herhangi bir bulgu gözlemlenmeli ve Magnusson/Kligman derecelendirme ölçeğine göre kaydedilmelidir. (Bakınız Ek-I) Diğer işlemler, ör. Histopatolojik incelemeler, cilt kıvrım kalınlığının ölçümü, şüpheli reaksiyonları aydınlatmak için yapılır.

1.5.2. Buehler test

1.5.2.1. Hazırlıklar

Sağlıklı, genç, yetişkin albino kobaylar, testten en az beş gün öncesinden laboratuvar koşullarına alıştırılırlar. Testten önce, hayvanlar rastgele ayrılırlar ve uygulama grupları oluşturulur. Tüylerin kırpılarak, tıraşlanarak veya kimyasal tüy dökücülerle uzaklaştırılması, kullanılan test yöntemine bağlıdır. Cilde zarar vermemeye dikkat edilmelidir. Hayvanlar test başlamadan önce ve testin sonunda tartılırlar.

1.5.2.2. Test koşulları

1.5.2.2.1. Test hayvanları

Albino kobayların labotaruvarda yaygın olarak kullanılan suşları tercih edilir.

1.5.2.2.2. Sayı ve cinsiyet

Erkek ve dişi hayvanlar kullanılabilir. Dişiler kullanılıyorsa, doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir.

Uygulama grubu olarak en az 20, kontrol grubu olarak da en az 10 hayvan kullanılır.

1.5.2.2.3. Doz seviyeleri

Kullanılan test maddesinin derişimi her bir başlatma maruz kalması için sistematik olarak iyi tolere edilmeli ve hafif fakat aşırı olmayan cilt tahrişi gösterecek en yüksek derişim olmalıdır. Başlatma maruz kalması için kullanılan derişim tahriş etmeyen en yüksek doz olmalıdır. Gerekliyse, uygun derişim iki veya üç hayvanın kullanıldığı pilot bir çalışmayla belirlenebilir.

Suda çözünebilen test maddeleri için taşıyıcı olarak su veya yüzey aktif maddenin seyreltik, tahriş etmeyen bir çözeltisini kullanmak uygundur. Diğer test maddelerinde başlatma işleminde %80 etanol/su, sataşma işleminde aseton tercih edilir.

1.5.2.3. İşlem

1.5.2.3.1. Başlatma

0. Gün - uygulama grubu
Bir böğür (kaburga ile kalça arasındaki kısım) tüylerden temizlenir. (oldukça kısa kırpılır) Yama sistemi uygun bir taşıyıcı içinde test maddesiyle tamamen yüklenmiş (taşıyıcı seçimi gerekçelendirilmelidir, sıvı test maddesi eğer uygunsa, seyreltilmemiş olarak) olarak uygulanır. Test yama sistemi test alanına uygulanır ve kapayıcı bir yama veya bölme ile 6 saat için uygun şekilde sarılarak cilde temas ettirilir.

Testin yama sistemi oklüzif (kapayıcı) olmalıdır. Bunun için yuvarlak veya kare pamuk pedler uygundur ancak yaklaşık alanı 4-6 cm^2 olmalıdır. Emilmeyi sağlamak için uygun koruyucu tasmalar ve zapt ediciler kullanılması tercih edilir. Yama sarılarak kullanılacaksa, ilave maruz kalma gerekebilir.

0. Gün - kontrol grubu
Bir böğür (kaburga ile kalça arasındaki kısım) tüylerden temizlenir (adım adım kırpılır) Taşıyıcı sadece muamele grubunda kullanılana benzer şekilde uygulanır. Yama sistemi test alanına uygulanır ve kapatıcı sargı bir yama veya bölme ile 6 saat için uygun şekilde giydirilerek cilde temas ettirilir. Yalancı bir kontrol grubuna gerek olmadığı gösterilirse, denenmemiş bir kontrol grubu kullanılabilir.

6-8 ve 13-15.Günler - uygulama ve kontrol grupları
Aynı uygulama 0. günde olduğu gibi ve aynı tarafın aynı test alanına (eğer gerekliyse tüyler temizlenir) 6-8. ve tekrar 1-15. günlerde yapılır.

1.5.2.3.2. Sataşma

27-29.Gün - uygulama ve kontrol grubu
Uygulama ve kontrol hayvanlarının böğürleri tüylerden temizlenir. (oldukça kısa kırpılır) Uygun miktarda test maddesi içeren kapayıcı bir yama veya bölme tahriş etmeyen en yüksek derişimde uygulama ve kontrol hayvanlarının uygulama yapılmamış böğrüne uygulanır.

İlgili olduğunda, sadece taşıyıcı olan kapayıcı bir yama veya bölme ayrıca hem uygulama, hem de kontrol hayvanlarının uygulama yapılmamış ön böğrüne uygulanır. Yamalar veya bölmeler uygun şekilde sarılarak 6 saat temas ettirilir.

1.5.2.3.3. Gözlemler ve derecelendirme

– yamanın uzaklaştırılmasından yaklaşık 21 saat sonra, alan tüylerden temizlenir;
– yaklaşık üç saat sonra (sataşma yamasının uygulanmasından yaklaşık 30 saat sonra) cilt reaksiyonları gözlenir ve ekte gösterilen derecelendirmeye göre kaydedilir;
– 30 saatlik gözlemden yaklaşık 24 saat sonra (sataşma yamasının uygulanmasından yaklaşık 54 saat sonra) cilt reaksiyonları tekrar gözlenir ve kaydedilir.

Test ve kontrol hayvanlarının kör okumaları teşvik edilir.

İlk sataşmadan elde edilen sonuçları netleştirmek gerektiğinde, (ilkinden yaklaşık bir hafta sonra yapılacak ikinci bir sataşma (örneğin, bir tekrar sataşma), uygun yerlerde yeni bir kontrol grubuyla sataşma üzerinde durulmalıdır. Bir sataşma ayrıca orjinal kontrol grubunda da uygulanabilir.

Başlatma ve sataşma işlemlerinde meydana gelen bütün cilt reaksiyonları ve sistemik reaksiyonları içine alan olağandışı bulgular gözlemlenmeli ve Magnusson/Kligman derecelendirme ölçeğine göre kaydedilmelidir. (Bakınız ek). Diğer işlemler, ör. Histopatolojik incelemeler, cilt kıvrım kalınlığının ölçümü, şüpheli reaksiyonları aydınlatmak için yapılır.

2. VERİLER (GPMT VE BUEHLER TESTİ)

Veriler, her bir gözlemde, her bir hayvan için cilt reaksiyonlarını gösteren bir tablo halinde özetlenmelidir.

3. RAPORLAMA (GPMT VE BUEHLER TESTİ)

Kobay testi öncesinde tarama testi uygulanmışsa, testin prosedürüyle ilgili detayları içeren tarifi ya da referansı (ör. Lokal Lenf Düğümü Yöntemi (LLNA), Fare Kulak Şişme Testi (MEST)) test ve referans maddeyle elde edilen sonuçlarla birlikte verilmelidir.

3.1. Test raporu (GMPT ve Buehler testi)

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test hayvanları:
- kullanılan kobayın ırkı;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, diyet. vs.;
- testin başında her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı.

Test koşulları:
- yama bölgesinin hazırlanma tekniği;
- kullanılan yama maddelerinin ve yama yapma tekniğinin detayları;
- başlatma ve testte kullanılan sataşma derişimlerine dair sonuçlarla birlikte pilot çalışmanın sonuçları
- test maddesinin hazırlanması, uygulanması ve uzaklaştırılmasıyla ilgili detaylar;
- taşıyıcı seçimi için gerekçe;
- kullanılan taşıyıcı ve test maddesi derişimleri, başlatma ve sataşma için maruz kalma ve uygulanan toplam madde miktarı

Sonuçlar:
- en son hassasiyet ve güvenilirlik kontrolü sonuçlarının özeti (Bakınız 1.3) ile birlikte kullanılan madde, derişim ve taşıyıcıyla ilgili bilgi;
- her bir hayvanda derecelendirme sistemi;

- gözlenen etkilerin doğasını ve derecesini anlatan tanımı;
- herhangi bir histopatolojik bulgu.

Sonuçların tartışılması

Sonuçlar

4. KAYNAKLAR

Bu yöntem OECD TG 406 ile eşdeğerdir.

Ek-I

TABLO:

Sataşma yama testi reaksiyonlarının değerlendirilmesi için Magnusson/Kligman derecelendirme ölçeği

0 = gözlenebilir bir değişiklik yok

1 = kesik veya yamalı kızarıklık

2 = orta şiddette ve bitişik kızarıklık

3 = yoğun kızarıklık ve şişlik

B.7 TEKRARLI DOZ (28 GÜNLÜK) TOKSİSİTESİ (AĞIZ YOLUYLA)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız: Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız: Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi çeşitli gruplardaki deney hayvanlarına günlük olarak ağız yoluyla ölçeklendirilmiş dozlarda uygulanır ve her gruba 28 gün süresince bir doz uygulanır. Uygulama süresince, hayvanların zehirlenme belirtilerini gözetleyebilmek için her gün yakından takip edilirler. Test sırasında ölen ya da öldürülen hayvanlara otopsi yapılır ve testin sonunda hayatta kalan hayvanlar da öldürülerek otopsileri yapılır.

Bu yöntem, özel bir sınır noktası olarak nörolojik (sinirsel) etkilere ve hayvanların klinik gözlemlerinin dikkatli bir şekilde yapılması gerektiğine dikkat çeker ve olabildiğince fazla bilgi elde edilmesi gerekliliği vurgulanır. Yöntem bu durumun etraflıca incelenmesini sağlayabilecek olan, nörotoksik (sinir hücreleri üzerinde zehir etkisi gösteren) potansiyelle birlikte kimyasalları tayin etmelidir. İlaveten, yöntem immunolojik (bağışıklık sistemine özgü) etkilerin belirtilerine ve üreme organlarının zehirlenmesine işaret eder.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hazırlıklar

Sağlıklı, genç, erişkin hayvanlar kontrol ve uygulama gruplarına rastgele olarak ayrılırlar. Kafesler, yerleştirmelere bağlı etkiler en az olacak şekilde konumlandırılmalıdırlar. Hayvanlar özgün şekilde belirlenir ve çalışmaya başlamadan en az beş gün öncesinden itibaren laboratuvar koşullarına alışmalarını sağlamak için kafeslerinde tutulurlar.

Test maddesi sonda, diyet ya da içme suyuyla uygulanır. Ağız yoluyla (oral) uygulanan yöntem, çalışmanın amacına ve maddenin fiziksel/kimyasal özelliklerine bağlıdır.

İhtiyaç duyuluyorsa, test maddesi uygun bir taşıyıcıda çözülür veya süspande edilir. Uygunsa, öncelikle sulu çözelti/süspansiyon, bunu takiben yağda çözelti/emülsiyon (örneğin Mısır yağı) ve daha sonra başka diğer taşıyıcılarda çözeltilerin kullanımı tavsiye edilir. Su dışındaki taşıyıcıların toksik özellikleri bilinmelidir. Taşıyıcı içindeki test maddesinin dayanıklılığı belirlenmelidir.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Test hayvanları

Tercih edilen kemirgen türü sıçandır, ancak kemirgenlerden başka türler de kullanılabilir. Laboratuvarda genellikle genç, sağlıklı, yetişkin hayvan ırkları kullanılmalıdır. Dişilerin doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Dozun uygulanması, hayvanlar sütten kesilir kesilmez ve her koşulda hayvanlar dokuz haftalık olmadan yapılmalıdır.
Kullanılan hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı, her iki cinsiyet için de en az değerde olmalı ve uygun ortalama değerin % 20'sini geçmemelidir.

Ağız yoluyla tekrarlı doz toksisite çalışması, uzun süreli bir çalışmanın hazırlığı olarak uygulanacaksa, her iki çalışmada da tercihen aynı ırk ve kaynaktan hayvanlar kullanılmalıdır.

1.4.2.2. Sayı ve cinsiyet

Her bir doz için en az 10 hayvan (5 erkek, 5 dişi) kullanılmalıdır. Ara ölümler planlanıyorsa, çalışma tamamlanmadan önce öldürülmesi planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır.

Ayrıca, 10 hayvandan oluşan bir ikincil test grubu (cinsiyet başına beş hayvan) 28 gün boyunca yüksek doza maruz bırakılabilir ve uygulama sonrasındaki 14 gün içinde tersinirlik, kalıcılık veya gecikmiş toksik etkiler için gözlemlenebilir.

10 kontrol hayvanından oluşan bir uydu grup (cinsiyet başına 5 hayvan) ayrıca kullanılır.

1.4.2.3. Doz seviyeleri

Genel olarak, en az üç test grubu ve bir kontrol grubu kullanılmalıdır. Test maddesi uygulanacak olanların haricinde kontrol grubunda yer alan hayvanlara, test grubu denekleriyle benzer şekilde işlem yapılır. Test maddesi uygulanırken taşıyıcı kullanılmışsa, kontrol grubu kullanılan en yüksek hacimde taşıyıcıyı almalıdır.

Diğer verilerin değerlendirilmesi sonucunda, 1000 mg/kg vücut ağırlığı/g dozunda hiçbir etki beklenmiyorsa, sınır testi yapılabilir. Uygun veri yoksa kullanıcak dozların belirlenmesine yönelik olarak, aralık belirlemek için bir çalışma yapılabilir.

Doz seviyeleri, test maddesi veya ilgili maddeler için mevcut herhangi bir toksisite ve (toksiko-) kinetik veriler dikkate alınarak seçilmelidir. En yüksek doz ciddi zararlara veya ölüme neden olmadan toksik etkilerinin uyarılması amacıyla seçilmelidir. Daha sonra, doz seviyelerinin dozaja bağlı herhangi bir cevabı ve en düşük dozda olumsuz etkinin gözlenmediğini (NOAEL) gösterecek şekilde, azalan sıralaması seçilmelidir. Azalan doz seviyelerini ayarlamak için 2-4 kat arasındaki aralıklar genelde uygundur ve dozajlar arasında geniş aralıklar (örneğin 10 faktörden daha fazla) kullanılması yerine dördüncü bir test grubunun eklenmesi çoğunlukla tercih edilir.

Diyet veya içme suyuyla uygulanan maddeler için, test maddesinin hiçbir miktarının normal beslenme veya su dengesiyle etkileşmediğinin garanti edilmesi önemlidir.

Test maddesi, ya sabit diyet derişimi (ppm) ya da hayvanların vücut ağırlığı üzerinden kullanılabilen sabit doz olarak uygulandığında; kullanılan alternatif belirtilmelidir. Sondayla

uygulanan maddeler için, doz her gün yakın zamanlarda verilmelidir ve hayvan vücut ağırlığına dayanarak sabit doz elde etmek için gerektiği şekilde ayarlanmalıdır.
Uzun süreli bir çalışmanın hazırlık aşaması olarak tekrarlı doz çalışması kullanılıyorsa, her iki çalışmada da benzer diyetler kullanılmalıdır.

1.4.2.4. Sınır testi

Eğer bir test en az 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün tek doz düzeyinde veya besin veya içme suyuyla (vücut ağırlığı belirlemelerine bağlı olarak içme suyu veya içme suyunda eşit yüzdede) yukarıda tanımlanan işlemler kullanılarak uygulandığında, gözlenebilir toksik etki oluşmuyorsa ve yapısal olarak ilişkili maddelerle ilgili verilere dayanılarak toksisite beklenmiyorsa, bu durumda üç doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. Sınır testi, insan maruz kalmasının daha fazla doz kullanılması gerektiğine işaret ettiği durumlar haricinde uygulanır.

1.4.2.5. Gözlem süresi

Gözlem süresi 28 gün olmalıdır. Uydu gruptaki takip eden gözlemler için planlanan hayvanlar ilaveten en az 14 gün daha herhangi bir uygulama yapılmadan, gecikmiş veya kalıcı toksik etkiler veya toksik etkilerin düzelme durumu için gözlem altında tutulmalıdır.

1.4.3. İşlem

Hayvanlar 28 gün boyunca haftanın yedi günü test maddesiyle, haftada beş gün diyet ihtiyaçları karşılanmış olacak şekilde doz uygulaması gerekçelendirilmelidir. Test maddesi sondayla uygulandığında, hayvanlara tek doz halinde, gavaj yöntemi ya da uygun boğaza salınan sonda kullanılarak yapılmalıdır. Tek seferde verilen en fazla sıvı hacmi, test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim, sulu çözeltilerin 2 ml/100 g vücut ağırlığında kullanılabildiği durumlar haricinde, 1 ml/100 g vücut ağırlığını aşmamalıdır. Tahriş edici ve normalde daha yüksek derişimlerde şiddetlenmiş etkiler açığa çıkaracak olan aşındırıcı maddeler dışında test hacmindeki değişiklikler, tüm doz seviyelerinde sabit hacim sağlamak için derişim ayarlaması yapılarak, en aza indirilmelidir

1.4.3.1. Genel gözlemler

Genel klinik gözlemler günde en az bir defa, tercihen günün aynı saatlerinde yapılmalı ve doz uygulandıktan sonraki olumsuz etkilerin pik süreleri de düşünülmelidir. Hayvanların sağlık koşulları kaydedilmelidir. Günde en az iki defa tüm hayvanlar hastalık ve ölüm oranı için kontrol edilmelidirler. Ölmek üzere olan, acı ve ağrı çeken hayvanlar farkına varıldığında uzaklaştırılmalı, insanca öldürülmeli ve hayvanlara otopsi yapılmalıdır.

İlk maruz kalmadan önce bir defa (karşılaştırılmalarına olanak sağlar) ve daha sonra da haftada en az bir defa olmak üzere, tüm hayvanlara detaylı klinik gözlemler yapılmalıdır. Bu gözlemler kafeslerin dışındaki standart bir ortamda tercihen her seferinde aynı saatlerde yapılmalıdır. Gözlemler dikkatlice, tercihen test uygulama laboratuvarı tarafından açıkça anlatılan skorlama sistemleri kullanılarak kaydedilmelidir. Test koşullarındaki değişimlerin az olması ve gözlemlerin tercihen uygulamadan habersiz gözlemciler tarafından yapıldığının garanti edilmesi için çaba gösterilmelidir. Not alınan belirtiler ciltteki, kürkteki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki değişiklikleri, salgılama başlaması, atılım ve otonomik aktiviteyi

(gözyaşı salgısı, piloereksiyon, gözbebeği büyüklüğü, solunumla ilgili olağan dışı durumlar) içermeli, ancak bunlarla sınırlı olmamalıdır.
Yürüyüşteki değişiklik, duruş ve klonik (spazm) veya tonik (kuvvetlendirici) hareketlerin varlığı yanında, dokunmaya cevap, basmakalıp davranışlar (aşırı tımarlanma, rutin olarak kendi etrafında dönme) veya tuhaf davranışı (örneğin kendini sakatlama, geriye doğru yürüme) ayrıca kaydedilmelidir.

Maruz kalmanın dördüncü haftasında, farklı tipteki uyarılarının duyusal tepkileri (örneğin işitsel, görsel ve proprioseptif (vücudun içinden gelen uyarıları duyan) uyarı), kavrama gücü değerlendirmesi ve motor aktivite değerlendirilmesi yapılmalıdır. İşlemlerin detayları literarürde verilmiştir (bakınız Genel Giriş Kısım B).

Dördüncü maruz kalma haftasındaki fonksiyonel gözlemler, bu çalışmayı takip eden 90 günlük bir subkronik toksisite çalışmasının ön-hazırlık aşaması halinde yürütüldüğünde, gözardı edilebilir. Bu durumda, fonksiyonel gözlemler takip eden çalışmada yer almalıdır.

Diğer taraftan, tekrarlı doz çalışmasından elde edilecek olan fonksiyonel gözlem verileri sonraki bir subkronik çalışma için doz seviyelerini seçme kabiliyetini geliştirebilir.

İstisnai olarak, aksi takdirde fonksiyonel test performansıyla anlamlı olarak etkileşecek olan kapsamlı toksisite belirtileri görülen gruplar için fonksiyonel gözlemler göz ardı edilebilir.

1.4.3.2. Vücut ağırlığı ve gıda/su tüketimi

Bütün hayvanlar en az bir hafta önce tartılmalıdırlar. Gıda ve su tüketimiyle ilgili ölçümler en az haftada bir yapılmalıdır. Eğer test maddesi içme suyuyla uygulanıyorsa, su tüketimi ayrıca en az haftada bir yapılmalıdır.

1.4.3.3. Hematoloji

Test süresinin sonunda aşağıdaki hematolojik incelemeler yapılmalıdır: hematokrit, hemoglobin derişimi, eritrosit sayımı, toplam ve diferansiyel lökosit sayımı, trombosit sayısı ve kan pıhtılaşma zaman/potansiyelinin ölçümü.

Belirlenen yerden, hayvanlar öldürülmeden hemen önce veya işlem sırasında, kan örnekleri alınmalı ve örnekler uygun koşullarda saklanmalıdır.

1.4.3.4. Klinik biyokimya

Dokulardaki, özellikle böbrek ve karaciğerdeki, majör toksik etkileri ortaya çıkarmak için hayvanlardan, öldürülmelerinden önce veya uygulamanın bir parçası olarak işlem sırasında alınan kan örnekleri üzerinde klinik biyokimya çalışmaları yapılmalıdır (ölmek üzere olanların dışındakiler ve/veya aralıklarla öldürülenler). Hayvanların kan örnekleri alınmadan

önceki gece boyunca aç bırakılmaları tavsiye edilir[1]. Plazma veya serum incelemeleri, sodyum, potasyum, glukoz, total kolesterol, üre, kreatinin, toplam protein ve albumin, hepatoselüler etkilerin gösterilmesi için (alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalin fosfataz, gama glutamil transpeptidaz ve sorbitol dehidrogenaz gibi) en az iki enzim içermelidir. İlave enzimlerin (hepatik (karaciğere ait) olanlar ve diğerleri) ve safra asitinin ölçümleri bu koşullar altında yararlı bilgiler sağlayabilir.

İsteğe bağlı olarak, takip eden idrar analiz tayinleri çalışmanın son haftasında zamanlanmış idrar hacmi toplanması; görünüş, hacim, ozmolalite veya özgül ağırlık, pH, protein, glukoz ve kan/kan hücreleri kullanılarak yapılabilir.

İlaveten, genel doku hasarlarının serum belirteçlerini belirlemek için çalışma yapılması göz önünde bulundurulmalıdır. Test maddesiyle ilgili bilinen özellikler şüphe yaratıyorsa veya yaratabiliyorsa, uygulanacak olan diğer belirlemeler kalsiyum, fosfat, açlık trigliseritleri, özel hormonlar, methemoglobin ve kolinesteraz gibi ilgili metabolik profilleri etkilerler. Bunların belirli sınıflara ait maddeler için veya olay bazında tespit edilmesi gerekir.

Sonuçta, türlere ve verilen maddenin gözlenen ve/veya beklenen etkilerine bağlı olarak esnek bir yaklaşıma gereksinim vardır.

Anahat verileri yeterli değilse, doz uygulanması başlatılması öncesinde hematolojik ve klinik biyokimya değişkenleri üzerinde durulmalıdır.

1.4.3.5. Ayrıntılı otopsi

Çalışmadaki bütün hayvanlara vücudun dış yüzeyinin, tüm deliklerin ve kafatasıyla ilgili, göğüsle ilgili ve karna ait boşlukların ve onların içeriklerinin dikkatlice incelendiği tam, detaylı bir otopsi yapılmalıdır. Tüm hayvanların karaciğer, böbrekler, adrenaller, testis, epididimisler, timüs, dalak, beyin ve kalbi yapışık olan dokulardan ayrılıp kesilmeli ve parçalara ayrıldıktan sonra kurumasından kaçınılarak ıslak ağırlıkları alınmalıdır.

Aşağıdaki dokular her iki doku tipi ve istenilen daha sonraki histopatolojik uygulama için, en uygun koruma ortamında muhafaza edilmelidir: bütün büyük lezyonlar, beyin (beyin, beyincik ve ponsları (ön beyin beyincik ve omurilik soğanı arasında yer alan yapı) içine alan örnek bölgeler), omurilik, mide, ince ve kalın bağırsak (Peyer parçalarını kapsar), karaciğer, böbrekler, adrenaller, dalak, kalp, timüs, tiroid, trake ve akciğerler (sabitleyiciyle şişirilip sonra batırılarak muhafaza edilirler), yumurtalıklar, yardımcı cinsiyet organları (örnegin rahim, prostat), mesane, lenf düğümleri (tercihen bir lenf düğümü uygulama yolunu kapsarken ve diğeri, uygulama yolundan uzak olan, sistemik etkileri kapsar) çevresel sinir (siyatik (kalça kemiğine ait) veya tibial (kaval kemiğine ait)) tercihen kasa oldukça yakın ve kemik iliğinin bir bölümü (veya alternatif olarak aspire edilerek yeni hazırlanmış kemik iliği). Klinik ve diğer bulgular ilave dokuların da incelenmesi gerektiğini gösterebilir. Test

[1]Serum ve plazmadaki bir dizi ölçüm için, özellikle de glukozda, gece boyunca aç bırakma tercih edilecektir. Bu tercih için temel neden, kaçınılmaz olarak aç kalmamaktan kaynaklanan artan değişkenliğin daha sinsi etkileri maskeleme eğilimi yaratması ve yorum yapılmasını zorlaştırmasıdır. Diğer taraftan, gece boyunca aç kalınması hayvanların genel metabolizmalarıyla etkileşebilir ve özellikle beslenme çalışmalarında, test maddesine günlük maruziyeti etkileyebilir. Eğer gece boyunca açlığa uyum sağlanmışsa klinik biyokimyasal belirlemeler çalışmanın 4. haftasında fonksiyonel gözlemlerden sonra yapılmalıdır.

maddesinin bilinen özelliklerine dayanılarak, hedef organ olduğu düşünülen organlar da ayrıca muhafaza edilmelidir.

1.4.3.6. Histopatolojik inceleme

Tam histopatoloji, kontrol ve yüksek doz grubundaki tüm hayvanların korunmuş organ ve dokulara uygunlanır. Yüksek doz grubunda uygulamaya bağlı değişiklikler gözlenirse, bu incelemeler diğer tüm doz gruplarındaki hayvanlara yapılmalıdır.
Bütün büyük lezyonlar incelenmelidir.

Uydu grup kullanıldığında, uygulama yapılan gruplarda etkilerin görüldüğü belirlenen doku ve organlar için histopatoloji yapılmalıdır.

2. VERİLER

Veriler ayrı ayrı alınmalıdır. İlaveten, bütün veriler her bir test grubu için testin başındaki hayvan sayısını, test sırasında ölü bulunan ve insani nedenlerle öldürülen hayvan sayısını ve bu ölümlerin/öldürülmelerin zamanları, toksisite belirtileri gösteren hayvan sayısını, gözlenen toksisite belirtilerinin tanımlarını başlangıç zamanını, toksik etkilerinin süresini ve ciddiyeti, hayvanların görüldüğü lezyon sayısı, lezyonların türü ve her bir lezyona sahip hayvan yüzdesi gösteren tablo halinde özetlenmelidir.

Mümkünse, rakamsal sonuçlar uygun ve genel kabul görmüş istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmelidir. İstatistiksel yöntemler çalışmanın oluşturulması sırasında belirlenmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, beslenme şekli, vs.;
- hayvanların ayrı ayrı testin başındaki, daha sonra haftalık aralıklarla ve testin sonundaki ağırlıkları

Test koşulları:
- taşıyıcı seçimi için gerekçe, eğer sudan farklıysa;
- doz düzeyi seçimi için gerekçe;
- test maddesinin formülasyonu/besin hazırlanması, ulaşılan derişim, hazırlık maddesinin kararlılığı ve homojenliği;
- test maddesinin uygulanmasıyla ilgili detaylar;

- besin/içme suyu test maddesi derişiminin (ppm) mevcut doza (mg/kg vücut ağırlığı/gün) çevrilmesi, eğer uygulanabiliyorsa;
- gıda ve yemek kalitesinin detayları.

Sonuçlar:
- vücut ağırlığı/vücut ağırlığı değişiklikleri;
- gıda ve su tüketimi, uygulanabiliyorsa;
- cinsiyete ve doz düzeyine bağlı, toksisite belirtilerini de içeren toksik cevapları;
- klinik gözlemlerin doğası, ciddiyeti ve süresi (geri dönüşümlü olup olmadıkları);
- duyusal aktivite, kavrama gücü ve motor aktivite değerlendirmeleri;
- hematolojik testler, ilgili anahat değerleriyle;
- klinik biyokimya testleri, ilgili anahat değerleriyle;
- öldürme sırasındaki vücut ağırlığı ve organ ağırlığı verileri;
- otopsi bulguları;
- bütün histopatolojik bulguların detaylı tanımları;
- varsa, absorpsiyonla (emilim) ilgili veriler;
- uygun yerlerde, sonuçlara ait istatistiksel işlemler.

Sonuçların Tartışılması.

Sonuçlar

4. KAYNAKLAR

Bu yöntem OECD TG 407'ye eşdeğerdir.

B.8 TEKRARLI DOZ (28 GÜNLÜK) TOKSİSİTESİ (SOLUNUMLA)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Maddenin partikül büyüklüğü dağılımı, buhar basıncı, erime noktası, kaynama noktası, parlama noktası ve varsa patlayıcılığı hakkında önceden bilgi sahibi olmak faydalıdır. Ayrıca Bölüm B Genel Giriş(A)'ya bakınız.

1.2. Tanımlar ve birimler

Bölüm B Genel Giriş(B)'ye bakınız.

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test edilecek madde çeşitli gruplardaki deney hayvanlarına günlük olarak kademeli konsantrasyonlarda, grup başına bir konsantrasyon olacak şekilde 28 gün boyunca uygulanır. Test maddesinin test ortamında uygun konsantrasyonlarda olmasına yardımcı olmak için bir taşıyıcının kullanıldığı durumlarda, taşıyıcı kontrol grubu da olmalıdır. Uygulama süresince, toksisite belirtilerinin belirlenmesi için hayvanlar her gün gözlenir. Test sırasında ölen hayvanlara ve test sonunda hayatta kalan deney hayvanlarına otopsi yapılır.

1.5. Kalite kriterleri

Yok

1.6. Test yöntemlerinin tanımlanması

1.6.1. Hazırlıklar

Hayvanlar deneyden en az beş gün öncesinden itibaren deneysel barınma ve beslenme koşullarında muhafaza edilirler. Test öncesinde, sağlıklı, genç, hayvanlar rasgele ve gerek duyulan grup sayılarına göre ayrılırlar. İhtiyaç duyulan durumlarda, test maddesine, test maddesinin test ortamında uygun konsantrasyonlarda olması için uygun bir taşıyıcı ilave edilebilir ve sonrasında taşıyıcı kontrol grubu da kullanılmalıdır. Doz uygulamasını kolaylaştırmak için taşıyıcı veya başka katkı maddeleri kullanılacaksa, bu maddelerin toksik etki göstermemelerinin gerektiği bilinmelidir. Uygunsa geçmişe yönelik veriler kullanılır.

1.6.2. Test koşulları

1.6.2.1. Deney hayvanları

Beklenmedik belirtiler görülmedikçe tercih edilen tür sıçandır. Yaygın olan laboratuvar suşları kullanılmalıdır. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişim aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin ± % 20'sini geçmemelidir.

1.6.2.2. Sayı ve cinsiyet

Her bir test grubu için en az 10 hayvan (5 erkek ve 5 dişi) kullanılmalıdır. Eğer dişiler kullanıyorsa doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekmektedir. Arada da hayvan öldürülmesi planlanıyorsa, hayvan sayısı çalışma tamamlanmadan önce öldürülmesi planlanan hayvan sayısı kadar artırılmalıdır.

Ayrıca, 10 hayvandan oluşan ikincil bir test grubu (cinsiyet başına beş hayvan) 28 gün boyunca yüksek konsantrasyon düzeyine maruz bırakılabilir ve uygulama sonrasındaki 14 gün içinde toksik etkilerinin tersinirliği, kalıcılığı veya gecikmiş olarak meydana gelme durumu için gözlemlenebilir.

10 kontrol hayvanından oluşan ikincil bir test grubu (cinsiyet başına 5 hayvan) ayrıca kullanılır.

1.6.2.3. Maruz kalma konsantrasyonu

Kontrol veya taşıyıcı bir kontrolle birlikte en az üç konsantrasyon değerine ihtiyaç duyulur. Taşıyıcı kullanılmışsa, taşıyıcının konsantrasyonu en yüksek olmalıdır. Test maddesi uygulanacak olanlar haricinde kontrol grubunda yer alan hayvanlar test grubundaki hayvanlarla eşit koşullarda tutulmalıdırlar. En yüksek konsantrasyonda toksik etkiler görülmeli ancak ölüm ya çok az sayıda gözlenmeli ya da gözlenmemelidir. En düşük konsantrasyonda, herhangi bir toksisite belirtisine rastlanmamalıdır. İnsan maruz kalımıyla ilgili kullanılabilir bir tahmin olduğu durumda, en düşük konsantrasyon bunu geçmelidir. İdeal olarak, ara konsantrasyonun en az seviyede gözlenebilir toksik etkisi oluşturması gerekir. Eğer birden fazla ara konsantrasyon kullanılmışsa, konsantrasyonlar dereceli toksik etki oluşturacak şekilde yer almalıdır. Düşük ve ara doz seviyeli gruplarla kontrol grubunda görülen ölüm sıklığı sonuçların anlamlı olarak değerlendirilmesini sağlayacak en az düzeyde olmalıdır.

1.6.2.4. Maruz kalma süresi

Günlük maruz kalma süresi 6 saat olmalıdır fakat diğer süreçler özel gereklilikleri karşılamasına ihtiyaç duyabilirler.

1.6.2.5. Donanım

Hayvanlar, yeterli oksijen içeriği ve eşit olarak dağılmış maruz kalma atmosferini temin etmek için saat başına en az 12 hava değişikliği yapan dinamik hava akışı sağlamak amacıyla tasarlanmış soluma donanımıyla test edilmelidirler. Bu amaçla test hayvanların sıkışmaması ve test maddesine solunum yoluyla maruz kalmaları için tasarlanmış bir odacık kullanılmıştır. Genel bir kural olarak, odacığın atmosferinin kararlılığını sağlamak amacıyla test

hayvanlarının toplam 'hacimleri' test odacığının hacminin % 5'ini geçmemelidir. Odacıktaki ayrı ayrı, ağız burun yolu, sadece baş veya tüm beden, maruz kalmaları kullanılabilir, ilk ikisi test maddesinin başka yollarla alımını azaltmaya yardımcı olur.

1.6.2.6. Gözlem süresi

Deney hayvanları toksisite belirtileri için uygulama ve iyileşme süresi boyunca günlük olarak gözlenmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlarla ölüm zamanları kaydedilmelidir.

1.6.3. İşlem

Hayvanlar test maddesine 28 gün boyunca haftada beş-yedi gün arası, günlük olarak maruz kalırlar. Herhangi bir ikincil test grubunda yer alan ve aşağıda belirtilen gözlemler için planlanan hayvanlar uygulama yapılmadan ilave olarak 14 gün daha tutulmalılar ve toksik etkilerin iyileşmeleri veya kalıcılıkları tespit edilmelidir. Testin uygulandığı sıcaklık 22 ±3 °C olmalıdır.

İdeal olarak bağıl nem oranı da % 30 ve %70 arasında olmalıdır, fakat bazı aerosollerin (askıda bulunan sıvı damlacıklarının) testleri gibi belli örneklerde bu durum uygulanabilir olmayabilir. Odacığın içindeki önemsiz derecede negatif basınç (≤ 5 mm su) test maddesinin çevreleyen alanın içine sızmasını engeller. Gıda ve su maruz kalma süresince esirgenmelidir.

Uygun bir analitik konsantrasyonlu kontrol sistemi bulunduran bir dinamik solunum sistemi kullanılmalıdır. Uygun maruz kalma konsantrasyonunu sağlamak için deneme testi tavsiye edilir. Hava akışı, maruz kalma süresince koşulların homojen olmasını sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır. Sistem kararlı maruz kalma koşullarına mümkün olduğunca çabuk ulaşmasını sağlamalıdır.

Aşağıda belirtilen ifadelerin ölçüm veya kontrolleri yapılmalıdır:

(a) hava akışının hızı (sürekli);
(b) test maddesinin nefes alma bölgesindeki mevcut konsantrasyonunun ölçümü
Maruz kalma süresi boyunca konsantrasyon, ortalama değerin ± %15'inden daha fazla değişkenlik göstermemelidir. Ancak bazı aerosollerin söz konusu olduğu durumlarda, bu şekilde seviye kontrollerinin yapılması mümkün olmayabilir, bu durumda daha geniş bir aralık kabul görür. Çalışmanın toplam süresi boyunca, günden-güne uygulanan konsantrasyonlar olabildiğince sabit olmalıdır. Aerosoller için test grubu başına haftada en az bir partikül büyüklüğü analizi yapılmalıdır.
(c) sıcaklık ve nem (mümkünse sürekli).

Maruz kalma sırasında ve maruz kalmayı takiben gözlem yapılır ve yapılan gözlemler sistematik olarak kaydedilir. Kayıtlar her bir hayvan için ayrı ayrı tutulmalıdır. Tüm hayvanlar günlük olarak gözlenmeli ve başlangıç zamanını da içeren toksisite belirtileri, dereceleri ve süreleri kaydedilmelidir. Gözlemler cilt ve tüylerdeki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki, solunum, dolaşım, otonom ve merkezi sinir sistemindeki değişikliklerle somatomotor aktivite ve davranışlarındaki değişikliklerini kapsamalıdır.Hayvanların ağırlık ölçümleri haftalık olarak yapılmalıdır. Ayrıca gıda tüketiminin de haftalık olarak ölçülmesi tavsiye edilir. Hayvanların birbirlerini yemeleri, dokuların otolizi veya yanlış yerleştirme gibi nedenlerle kaybedilmediklerinin ispat edilmesi için düzenli olarak gözlenmesi gereklidir.

Çalışma süresi sonunda uygulama grubundaki sağ kalan tüm hayvanlara otopsi yapılır. Ölmek üzere olan, acı ve ağrı çeken hayvanlar farkına varıldığında uzaklaştırılmalı, insanca öldürülmeli ve hayvanlara otopsi yapılmalıdır.

Aşağıdaki incelemeler kontrol grupları da dâhil edilerek tüm hayvanlara testin sonunda uygulanır:

(i) hematoloji, hematokrit hemoglobin konsantrasyonu, eritrosit sayısı; toplam ve türevsel lökosit sayısı ve pıhtılaşma potansiyelinin ölçümü dâhil olmalıdır;
(ii) klinik kan biyokimyası karaciğer ve böbrek fonksiyonlarından en az birini içine alır: serum alanin aminotransferaz (geçmişte glutamik piruvik transaminaz olarak bilinir), serum aspartat aminotransferaz (geçmişte glutamik okzaloasetik transaminaz olarak bilinir), üre azotu, albumin, kanda kreatinin, toplam bilirubin ve toplam serum protein ölçümleri;

Yeterli toksikolojik değerlendirmeler için gerekli olabilecek diğer belirlemelere kalsiyum, fosfor, klorür, sodyum, potasyum, lipitlerin analizi, açlık glikoz analizi, hormonlar, asit/baz dengesi, methemoglobin ve kolinesteraz aktivitesi dahildir.

Gerekli yerlerde gözlenen toksik etkilerin araştırmasını genişletmek için ilave klinik biyokimya uygulamaları yapılabilir.

1.6.3.1. Kapsamlı otopsi

Çalışmadaki bütün hayvanlara tam kapsamlı otopsi yapılmalıdır. En az karaciğer, böbrekler, adrenaller, akciğerler ve testis parçalara ayrıldıktan sonra kurumasından olabildiğince kaçınılarak ıslak ağırlıkları tartılmalıdır.

Organlar ve dokular (soluk borusu, karaciğer, böbrekler, dalak, testis, adrenaller, kalp ve büyük doku bozuklukları olan herhangi bir organ veya büyüklükteki değişiklikler) olası histopatolojik inceleme için uygun bir ortamda muhafaza edilmelidir. Akciğerler, eksiksiz alınmalı, tartılmalı ve akciğer yapısını elde etmek için uygun bir saptayıcı ile muamele edilmelidir.

1.6.3.2. Histopatolojik inceleme

Yüksek konsantrasyon grubuyla kontrol grubunda, muhafaza edilmiş organ ve dokularda histopatolojik inceleme yapılmalıdır. En yüksek dozdaki test maddesinin zarar verdiği organlar, daha düşük dozların verildiği gruplarda incelenmelidir. Herhangi bir ikincil test grubundaki hayvanlar, diğer muamele gruplarında etki gösterdiği teşhis edilen bu organ ve dokulara özel önem gösterilerek histolojik olarak incelenmelidir.

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu, testin başlangıcındaki hayvan sayısını ve her bir doku bozukluğu türüne ait hayvan sayısını gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir.

Gözlenen tüm sonuçlar uygun bir istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Bilinen herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- tür, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli vs.;
- test koşulları:

maruz kalma düzeneğinin tanımı tasarımı, tipi, boyutları, hava kaynağı, aeresol üretme sistemi, havalandırma yöntemi ve bu düzenek kullanıldığında hayvanların test odacığının içindeki barınma yöntemini kapsamalıdır. Sıcaklık, nem, aeresol konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü dağılımı ölçüm ekipmanı tanımlanmalıdır.

Maruz kalma verileri:

Tablo haline getirilmeli ve ortalama değerler, değişkenlik ölçümü (örneğin, standard sapma) ile birlikte sunulmalıdır, mümkünse, aşağıdakileri içerir:

a) solunum ekipmanındaki hava akış hızı;
b) havanın nemi ve sıcaklığı;
c) düşük konsantrasyonlar (havanın hacmine bölünmüş solunum ekipmanına beslenen test maddesinin toplam miktarı)
ç) taşıyıcının yapısı, eğer kullanıldıysa;
d) test solunum bölgesindeki mevcut konsantrasyon
e) Kütle medyan aerodinamik çapı (MMAD) ve geometrik standard sapma(GSD);

- cinsiyet ve konsantrasyona bağlı toksik cevap verileri;
- çalışma sırasındaki ölüm zamanları veya hayvanların deney sonuna kadar sağ kalıp kalmadıkları;
- toksik etkileri ile diğer etkilerin tanımları; etki-gözlenmeyen düzey;
- her anormal belirtinin ve bir sonraki aşamasının gözlem süresi;
- gıda ve vücut ağırlığı verileri;
- uygulanan hematolojik testler ve sonuçları;
- kullanılan klinik biyokimya testleri ve sonuçları
- otopsi bulguları;
- tüm histopatolojik bulguların detaylı tanımları;
- uygun yerlerde, sonuçlara ait istatistiksel işlemler;
- sonuçların tartışılması;
- sonuçların yorumlanması

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.9 TEKRARLI DOZ (28 GÜNLÜK) TOKSİSİTESİ (DERİ YOLUYLA)

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi, her gün çeşitli gruplardaki deney hayvanlarının derilerine, grup başına bir doz kullanılarak 28 gün boyunca uygulanır. Uygulama süresince hayvanlar toksisite belirtilerine karşı her gün gözlemlenir. Test sırasında ölen hayvanlarla deney sonunda hayatta kalan deney hayvanlarına otopsi yapılır.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yöntemlerinin tanımlanması

1.6.1. Hazırlıklar

Test hayvanları testten en az beş gün öncesinden deneysel barınma ve beslenme koşullarında tutulurlar. Test öncesinde sağlıklı, genç hayvanlar kontrol ve uygulama gruplarına rasgele ayrılırlar. Teste başlamadan kısa bir süre öncesinde kürk kırpılarak test hayvanının gövdesinin sırt bölgesinden uzaklaştırılmalıdır. Traş işlemi uygulanabilir ama bu testten yaklaşık 24 saat önce uygulanmalıdır. Haftalık aralıklarla tüylerin traş edilmesinin veya kırpılmasının tekrar edilmesi gereklidir. Kürk kırpılırken veya traş edilirken, deriye zarar vermekten kaçınılmalıdır. Vücut yüzeyinin % 10'undan az olmayacak bir alan test maddesinin uygulanması için temizlenir.

Hayvanın ağırlığı temizlenmesi gereken alana ve kaplanması gereken boyutlara karar verilirken dikkate alınmalıdır. Eğer uygunsa toz haline getirilebilen katı maddeler test edilirken, test maddesi cilde iyi temas etmesi için yeterli miktarda suyla veya gerekli durumlarda uygun bir taşıyıcıyla ıslatılmalıdır. Sıvı haldeki test maddeleri seyreltilmemiş halde kullanılmalıdır. Haftada beş-yedi gün arası günlük uygulama yapılır.

1.6.2. Test koşulları

1.6.2.1. Deney hayvanları

Yetişkin sıçan, tavşan veya kobay kullanılabilir. Diğer türler de kullanılabilir ancak kullanımları gerekçelendirilmelidir. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişim aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin ± % 20'sini geçmemelidir.

1.6.2.2. Sayı ve cinsiyet

Her bir doz için sağlıklı bir cilde sahip en az 10 hayvan (5 dişi ve 5 erkek) kullanılmalıdır. Dişilerin, hiç doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Eğer arada da hayvan öldürülmesi planlanıyorsa, gruplardaki hayvan sayısı, çalışma tamamlanmadan öldürülmesi planlanan hayvan sayısı kadar artırılmalıdır. Ayrıca, 10 hayvandan oluşan bir ikincil test grubu (cinsiyet başına beş hayvan) 28 gün boyunca yüksek doz düzeyine maruz bırakılabilir ve uygulama sonrasındaki 14 gün içinde toksik etki tersinirlikleri, kalıcılıkları veya gecikmiş etkileri açısından gözlemlenmelidirler. 10 kontrol hayvanından oluşan bir ikincil test grubu (cinsiyet başına 5 hayvan) ayrıca kullanılır.

1.6.2.3. Doz seviyeleri

Taşıyıcı kullanıldıysa, kontrol veya taşıyıcı kontrol grubuna ait en az üç doz düzeyi kullanılmalıdır. Maruz kalma süresi günde en az altı saat olmalıdır. Test maddesinin uygulanması her gün aynı saatte yapılmalıdır ve hayvan vücut ağırlığına dayanarak sabit doz seviyeleri elde etmek için uygulanan maddenin miktarı, aralıklarla (haftada ya da iki haftada bir) ayarlanmalıdır. Test maddesiyle muamele edilenler dışında, kontrol grubundaki hayvanlar test grubundakilerle eşit şekilde tutulmalıdırlar. Dozun uygulanmasını kolaylaştırmak için taşıyıcı kullanılan durumlarda, taşıyıcı kontrol grubuna da uygulama grubuyla aynı şekilde doz uygulanmalıdır ve en yüksek doz grubu ne kadar aldıysa, aynı miktarı almalıdır. En yüksek doz toksik etkilerle sonuçlanmalı ancak çok az ölüm olmalı ya da hiç olmamalıdır.

En düşük doz herhangi bir toksisite meydana getirmemelidir. İnsan maruz kalımına dair kullanılabilir bir tahmininin olduğu durumlarda, en düşük değer bu değeri geçmelidir. İdeal olarak ara doz en az gözlenebilir toksik etki meydana getirmelidir. Eğer birden fazla ara doz kullanılmışsa doz seviyelerine göre kademeli olarak toksik etki oluşturacak şekilde yerleştirilmelidir. Kontrollerdeki düşük ve ara gruplarda sonuçların anlamlı olarak değerlendirilmesi için ölüm oluşma sıklığının düşük olması gerekir.

Eğer test maddesinin uygulanması ciddi cilt tahrişine neden oluyorsa, konsantrasyonlar düşürülmelidir. Bu durum, yüksek dozdaki diğer toksik etkilerin azalmasıyla veya yok olmasıyla sonuçlanabilir. Ayrıca, cilt çok kötü şekilde hasar görmüşse çalışmaya son verilmesi ve daha düşük konsantrasyonlu yeni bir çalışma yürütülmesine ihtiyaç duyulabilir.

1.6.2.4. Sınır testi

1000 mg/kg doz seviyeli veya olası insan maruz kalmasıyla ilgili daha yüksek doz seviyeli bir ön çalışmada hiçbir toksik etki gözlenmiyorsa, ilave testlerin üzerinde düşünülmesine gerek yoktur.

1.6.2.5. Gözlem süresi

Deney hayvanları, toksisite belirtileri için günlük olarak gözlenmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlar ve ölüm zamanları kaydedilmelidir.

1.6.3. İşlem

Hayvanlar ayrı ayrı kafeslere konmalıdırlar. Hayvanlara test maddesiyle haftanın her günü, 28 gün boyunca uygulanır. Herhangi bir ikincil test grubunda devam eden gözlemler için programlanan hayvanlar, ilave bir 14 gün daha uygulama olmadan tutulmalı, toksik etkilerin düzelip düzelmediği belirlenmelidir. Maruz kalma süresi günde en az altı saat olmalıdır.

Test maddesi, toplam vücut yüzey alanının %10'u kadar bir alan üzerine tek tip uygulanır. Oldukça toksik maddelerle kaplanan yüzey alanı daha az olabilir fakat mümkün olduğunda geniş bir alan ince ve tek tip bir katman halinde kaplanmalıdır.

Test maddesi, maruziyet süresi boyunca tahriş etmeyen bir gazlı bezle cilde temas ettirilmelidir. Test yapılacak alan ayrıca gazlı bezi muhafaza etmek için uygun bir şekilde tekrar kaplanmalıdır ve hayvanların test maddesini yememeleri sağlanmalıdır. Test maddesinin yenmesini engellemek için uygun tasmalar kullanılabilir ancak hayvanların tamamen hareketsiz olmaları tavsiye edilen bir yöntem değildir. Alternatif olarak koruyuculu tasmalar kullanılabilir. Maruz kalma süresinin sonunda, yapılabiliyorsa suyla veya uygun başka temizleme yöntemleriyle kalan test maddesi ciltten uzaklaştırılmalıdır.

Tüm hayvanlar günlük olarak gözlenmeli ve başlangıç zamanını da içeren toksisite belirtileri, dereceleri ve süreleri kaydedilmelidir. Gözlemler cilt ve tüylerdeki, gözlerdeki, mukoz (sümüksü) membranlardaki, solunum, dolaşım, otonom ve merkezi sinir sistemindeki değişikliklerle somatomotor aktivite ve davranışlarındaki değişikliklerini kapsamalıdır.Hayvanların ağırlıklarının ölçümleri haftalık olarak yapılmalıdır. Ayrıca gıda tüketiminin de haftalık olarak ölçülmesi tavsiye edilir. Hayvanların birbirlerini yemesi, dokuların otolizi veya yanlış yerleştirme gibi nedenlerle kaybedilmediklerinin ispat edilmesi için düzenli olarak gözlenmesi gereklidir. Çalışma süresi sonunda ikincil testi bulunmayan uygulama grubundaki sağ kalan tüm hayvanlara otopsi yapılır. Ölmek üzere olan, acı ve ağrı çeken hayvanlar farkına varıldığında uzaklaştırılmalı, insanca öldürülmeli ve hayvanlara otopsi yapılmalıdır.

Aşağıdaki incelemeler kontrol grupları da dâhil olmak üzere tüm hayvanlara testin sonunda uygulanır:

(i) hematoloji, hematokrit hemoglobin derişimi, eritrosit sayısı, toplam ve türevsel lökosit sayısı ve pıhtılaşma potansiyelinin ölçümü dahil olmalıdır;

(ii) klinik kan biyokimyası karaciğer ve böbrek fonksiyonlarından en az birini içine alır: serum alanin aminotransferaz (geçmişte glutamik piruvik transaminaz olarak bilinir), serum aspartat aminotransferaz (geçmişte glutamik okzaloasetik transaminaz olarak bilinir), üre azotu, albumin, kanda kreatinin, toplam bilirubin ve toplam serum protein ölçümleri;

Yeterli toksikolojik değerlendirmeler için gerekli olabilecek diğer belirlemelere kalsiyum, fosfor, klorür, sodyum, potasyum, lipitlerin analizi, açlık glikoz analizi, hormonlar, asit/baz dengesi, methemoglobin ve kolinesteraz aktivitesi dahildir.

Gerekli yerlerde gözlenen toksik etkilerin araştırmasını genişletmek için ilave klinik biyokimya uygulamaları yapılabilir.

1.6.4. Kapsamlı otopsi

Çalışmadaki bütün hayvanlara kapsamlı otopsi yapılmalıdır. En az karaciğer, böbrekler, adrenaller, akciğerler ve testis parçalara ayrıldıktan sonra kurumasından olabildiğince kaçınılarak ıslak ağırlıkları tartılmalıdır. Organlar ve dokular (soluk borusu, karaciğer, böbrekler, dalak, testis, adrenaller, kalp ve büyük doku bozukluğu (lezyonlar) olan herhangi bir organ veya büyüklükteki değişiklikler) ileride olası histopatolojik inceleme için uygun bir ortamda muhafaza edilmelidir.

1.6.5. Histopatolojik incelemeler

Yüksek doz grubunda ve kontrol grubunda, organ ve dokularda histopatolojik incelemeler yapılmalıdır. En yüksek dozdaki test maddesinin zarar verdiği organlar, daha düşük dozların verildiği gruplarda incelenmelidir. Herhangi bir ikincil test grubundaki hayvanlar, diğer muamele gruplarında etki gösterdiği teşhis edilen bu organ ve dokulara özel önem gösterilerek histolojik olarak incelenmelidir

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu, testin başlangıcındaki hayvan sayısını ve her bir doku bozukluğu türüne ait hayvan sayısını gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Gözlenen tüm sonuçlar uygun bir istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Bilinen herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- hayvan verileri (tür, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli vs.);
- test koşulları (cilt temizleme yöntemi ve pansuman şekli: emilmeye uygun veya değil);
- doz seviyeleri (kullanıldıysa, taşıyıcınınki de dahil) ve derişim değerleri);
- etki gözlenmeyen seviye, mümkün olan yerlerde;
- cinsiyet ve doza bağlı toksik cevap verileri;
- çalışma sırasındaki ölümlerin zamanı veya hayvanların çalışma bitinceye kadar sağ kalıp kalmadıkları;
- toksik etkiler ve diğer etkiler;
- her bir anormal belirtinin gözlendiği zaman ve sonraki seyri;
- gıda ve vücut ağırlığı verileri;
- uygulanan hematolojik testleri ve sonuçları;
- uygulanan klinik biyokimya testleri ve sonuçları;
- otopsi bulguları;
- tüm histopatolojik bulgularla ilgili detaylı tanımlama;
- mümkün yerlerde sonuçların istatistiksel uygulaması;
- sonuçların tartışılması;
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.10 MUTAJENİTE IN VITRO MEMELİ KROMOZOMAL BOZUKLUK TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 473, In Vitro Memeli Kromozom Bozukluğu Testi (1997)'nin tekrarıdır.

1.1. Giriş

In vitro kromozomal bozukluk testinin amacı, kültürlenmiş memeli hücrelerinde yapısal kromozom bozukluğu (chromosomal aberration) meydana getiren ajanları belirlemektir (1)(2)(3). Yapısal bozukluklar kromozom veya kromatit olarak iki tip olabilir. Kimyasal mutajenlerin çoğunun neden olduğu bozukluklar kromatit tiptekidir fakat ayrıca kromozom tipte bozukluklar da meydana gelir. Poliploididdeki artış kimyasalın sayısal bozuklukları harekete geçirme potansiyeline sahip olduğuna işaret eder. Yine de bu yöntem sayısal bozuklukların ölçülmesi için tayin edilmemiştir ve düzenli olarak bu amaç için kullanılmamaktadır. Kromozom mutasyonları ve bunlara bağlı olaylar, insandaki pek çok genetik hastalığın nedenidir ve somatik hücrelerin onkogenlerinde (kanserojen genlerinde) ve tümör baskılayıcı genlerinde değişikliklere neden olan kromozom değişmeleri (mutasyonları) ve ilgili olaylar, insanda ve deney hayvanlarında, kanserin harekete geçmesinde rol oynadığına dair kuvvetli kanıtlar vardır.

In vitro kromozomal bozukluk testi, yerleşik hücre dizisi kültürlerine, hücre suşlarına veya birincil hücre kültürlerine uygulanabilir. Kullanılan hücreler, kültürdeki büyüme kabiliyetlerine, karyotiplerinin kararlılıklarına, kromozom sayısına, kromozom çeşitliliğine, kromozom bozukluklarının kendiliğinden olma sıklığına bağlı olarak seçilirler.

İn vitro yürütülen testler genellikle, dışarıdan kaynaklı bir metabolik aktivasyon kaynağı kullanımını gerektirir. Bu metabolik aktivasyon sistemi, memeli in vivo koşullarına tamamen benzemez. Özgün mutajeniteyi (genlerde değişimlerin meydana gelmesini) yansıtmayan veya pH, ozmolalite değişiklerinden ya da yüksek seviyede hücre toksisitesinden (sitotoksisite) kaynaklanan pozitif sonuçlar yaratacak koşullardan kaçınılmasına dikkat edilmelidir (4)(5).

Test, olası memeli mutajenleri ve kanserojenleri taramak için kullanılır. Bu testte pozitif sonuç veren bileşikler memelilerde kansere neden olan maddelerdir, ancak bu test ve kanserojenik maddeler arasında tam bir ilişki bulunmamaktadır. İlişki kimyasal sınıfa bağlıdır ve bu testle belirlenemeyen kanserojenik maddelerin olduğuna dair giderek artan kanıtlar mevcuttur, çünkü bu kanserojenik maddeler doğrudan DNA hasarı dışında bir mekanizma sergilerler.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Kromatit-tip bozukluk: Yapısal kromozom hasarı tekli kromatit kırılması veya kromatitler arası kırılma ve birleşme olarak ifade edilir.

Kromozom-tipi bozukluk: Yapısal kromozom hasarı, özdeş yerlerdeki her iki kromatitin kırılması veya kırılıp birleşmesi olarak ifade edilir.
Endoredublikasyon: DNA replikasyonunun S fazından sonraki bir işlemdir, çekirdek mitoza gitmez fakat başka bir S fazı süreci başlatır. Sonuç, 4, 8, 16, . ..kromatitli kromozomlardır.

Boşluk (gap): bir kromatitin genişliğinden daha küçük genişlikte ve minimum yanlış kromatit dizimli akromatik bir doku bozukluğudur.

Mitotik indeks: metafazdaki hücre sayısının, hücre populasyonunda gözlenen toplam hücre sayısıyla bölümünün oranıdır; o populasyondaki çoğalma derecesinin göstergesidir.

Sayısal bozukluk: kullanılan hücrelerin normal kromozom sayısındaki değişiklikler.

Poliploidi: haploid kromozom sayısının (n) diploid sayı haricindeki bir sayıyla çarpımı (örneğin, 3n, 4n.....).

Yapısal bozukluk: Kromozom yapısında, hücre bölünmesinin metafaz aşamasındamikroskobik incelemeyle saptanabilen değişikliktir; silinmeler ve parçalanmalar ara ve iç değişiklikler olarak gözlenir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Hücre kültürleri test maddesine hem metabolik aktivasyonla hem de metabolik aktivasyon olmadan maruz kalır. Hücre kültürlerinin test maddesine maruz kalmasından sonra daha önceden belirlenen aralıklarda, kültürler metafaz-durdurucu maddelerle muamele edilir (örneğin, Kolsemid veya kolşisin), toplanır, boyanır ve metafaz hücreleri kromozom bozukluklarının varlığı için mikroskobik olarak incelenir.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hazırlıklar

1.4.1.1. Hücreler

Çeşitli hücre dizileri, suşları veya insan hücresi de dahil birincil hücre kültürleri kullanılabilir. (örneğin, Çin hamster fibroblastları, insan veya diğer memelilerin periferal (çevresel) kan lenfositleri)

1.4.1.2. Ortam ve kültür koşulları

Kültürlerin elde edilmesinde uygun kültür ortamı ve inkübasyon koşulları (kültür kapları, CO_2 derişimi, sıcaklık ve nem) kullanılmalıdır. Yerleşik hücre dizileri ve suşları, model kromozom sayısında kararlılıkları ve mikoplazma kirlenmesinin olup olmaması açısından rutin olarak kontrol edilmeli ve kirlilik varsa kullanılmamalıdırlar. Hücreler için normal hücre döngüsü zamanı ve kültür koşulları bilinmelidir.

1.4.1.3. Kültürlerin hazırlanması

Sabit hücre dizileri ve suşları: Hücreler stok kültürlerden oluşturulurlar, kültürlerin toplanmasından önce akıcı olmayan duruma ulaşmadığı yoğunluktaki kültür ortamına ekilir ve 37 °C'de inkübe edilirler.

Lenfositler: bir pıhtılaşmayı önleyici (örneğin, Heparin) muamele edilen tam kan veya sağlıklı numunelerden elde edilen ayrılmış lenfositler, mitojen (örneğin, Fitohemogglutinin) içeren kültür ortamına ilave edilirler ve 37°C'de inkübe edilirler.

1.4.1.4. Metabolik aktivasyon

Hücreler, test maddesine metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda maruz bırakılmalıdırlar. En yaygın kullanılan sistem, Aroklor 1254 (6)(7)(8)(9) veya fenobarbitonla ß–naftoflavon karışımı (10)(11)(12) gibi enzim aktive eden ajanlarla muamele edilen kemirgenlerin karaciğerlerinden elde edilen kofaktör-destekli post-mitokondriyal fraksiyondur (S9).

Son-mitokondriyal kısım genellikle sonuç test ortamının %1–10 v/v, derişim aralığında kullanılır. Metabolik aktivasyon sisteminin koşulları test edilen kimyasalın sınıfına bağlı olabilir. Bazı durumlarda, son-mitokondriyal kısmına ait birden fazla derişim kullanılması uygun olabilir.

Özgün aktivitegösteren enzimleri ifade eden genetik olarak tasarlanmış hücre dizileri dahil bir dizi gelişme içsel olaylardan kaynaklanan aktivasyon için potansiyel sağlayabilir. Kullanılan hücre dizilerinin seçimi (test maddesinin metabolizmasının sitokrom P450 benzer enzimle ilgisi gibi) bilimsel olarak gerekçelendirilmelidir

1.4.1.5. Test maddesi/hazırlık

Hücrelerin muamele edilmelerinden önce uygunsa, katı test maddesi uygun çözücüler veya taşıyıcılar içinde çözünmeli veya süspande edilmelidir. Sıvı test maddeleri muameleden önce test sistemine doğrudan eklenebilirler ve/veya seyreltilebilirler. Kararlılığıyla ilgili veriler saklanmasının kabul edilebilirliğini göstermedikçe test maddesinin taze hazırlanmış olanları uygulanmalıdır.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Çözücü/taşıyıcı

Çözücü/taşıyıcı, test maddesiyle kimyasal reaksiyona girmemeli ve hücrelerin sağ kalımlarıyla ve S9 aktivitesiyle uyumlu olmalıdır. Çok iyi bilinen çözücüler/taşıyıcılar dışındakiler kullanılırsa, muhteviyatları uyumlu olduklarını gösteren verilerle desteklenmelidir. Mümkün olan yerlerde, sulu çözelti/taşıyıcının kullanılması ilk önce göz önünde bulundurulması tavsiye edilir. Suda kararsız olan maddeler test edilirken, kullanılan organik çözeltilerde su olmamalıdır. Su, moleküler bir elek ilave edilerek uzaklaştırılabilir.

1.4.2.2. Maruz kalma derişimleri

En yüksek derişimi belirlerken, dikkate alınması gereken kriterler arasında sitotoksisite, test sisteminde çözünürlük, pH değişiklikleri ve ozmolalite vardır. Sitotoksisite, hücre kültür flaskını kaplama derecesi gibi, canlı hücre sayısı veya mitotik indeks gibi hücre bütünlüğünün ve büyümesin uygun göstergeleri kullanılarak, asıl deneyde metabolik aktivasyonun hem varlığında hem de yokluğunda belirlenmelidir. Sitotoksisite ve çözünürlüğün bir ön deneyde belirlenmesi daha uygun olabilir.

Analiz edilebilen en az üç derişim kullanılmalıdır. Sitotoksisite meydana gelen yerlerde, bu derişimler, maksimum toksisiteden, minimum toksisiteye ya da hiçbir toksik etki yaratmayan bir aralığa dahil olmalıdırlar, bu da genellikle derişimlerin 2 ve $\sqrt{10}$ arasındakinden daha fazla olmayan bir faktörle ayrılmaları gerektiği anlamına gelir. Toplama zamanında, en yüksek konsantrasyon hücre sayımının veya mitotik indeksin akıcı olmama (confluency) derecesinde önemli bir düşüşe neden olmalıdır (hepsi %50'den büyüktür).

Mitotik indeks sitotoksik/sitostatik etkilerin tek dolaylı ölçüm ifadesidir ve muamele sonraki süreye bağlıdır. Ne var ki mitotik indeks, diğer toksisite ölçümlerinin kullanışsız ve uygulanamaz olabildiği süspansiyon kültürler için kabul edilebilirdir. Ortalama Üreme Zamanı (AGT) gibi hücre döngüsü kinetiğiyle ilgili bilgiler, yardımcı bilgi olarak kullanılabilir. AGT, buna rağmen, her zaman gecikmiş alt popülasyonların varlığını açıklamayan genel bir ortalamadır ve hatta ortalama üretim zamanındaki hafif artışlar, bozuklukların verimlilik süresindeki önemli gecikmelerle ilişkilendirilebilir.

Nispeten sitotoksik olmayan maddeler için, maksimum test derişimi 5 µl/ml, 5 mg/ml veya 0.01 M olmalıdır. Çözünemedikleri derişimden daha düşük derişimlerde toksik etki göstermeyen, nispeten çözünemeyen maddeler için, kullanılan en yüksek doz, uygulama süresinin sonundaki nihai kültür ortamında çözünebilirlik sınırının üzerinde bir konsantrasyon olmalıdır. Bazı durumlarda (örneğin, toksisitenin sadece en düşük çözülemez derişimden daha yüksekte görüldüğü zaman) görülebilir çökelme meydana getiren birden fazla derişimin test edilmesi tavsiye edilir. Uygulamanın başındaki ve sonundaki çözünürlüğün tayin edilmesi uygun olabilir, çünkü çözünürlük test sistemindeki maruz kalma boyunca hücrelerin, S9'un, serum, vs'nin varlığına bağlı olarak değişebilir. Çözünmezlik çıplak gözle belirlenir. Çökelti skorlamayı etkilememelidir.

1.4.2.3. Negatif ve pozitif kontroller

Eş zamanlı pozitif ve negatif (çözücü veya taşıyıcı) kontroller, metabolik aktivasyonun hem varlığında hem de yokluğunda her bir deneyde yer almalıdır. Metabolik aktivasyon kullanıldığında, pozitif kontrol kimyasalı, mutajenik cevap vermek için aktivasyona ihtiyaç duymalıdır. Pozitif kontroller, test sisteminin güvenilirliğini gösteren ve bazal seviyenin üzerinde tekrarlanabilir ve tayin edilebilir artışa neden olması beklenenmaruz kalma seviyelerinde, klastojen olduğu bilinen maddeler olmalıdır. Dozlar etkilerin açıkça görülebileceği şekilde seçilebilir fakat işaretli lamların okuyucu tarafından hemen anlaşılabilmesini sağlamaz.

Pozitif kontrol madde örnekleri:

Metabolik Aktivasyon koşulu	Madde	CAS No.	EINECS No.
Dış kaynaklı metabolik aktivasyonun yokluğu	Metil metansülfonat	66-27-3	200-625-0
	Etil metansülfonat	62-50-0	200-536-7
	Etil nitrozo üre	759-73-9	212-072-2
	Mitomisin C	50-07-7	200-008-6
	4–Nitrokinolin–N–oksit	56-57-5	200-281-1
Dış kaynaklı metabolik aktivasyonun varlığı	Benzo[a]piren	50-32-8	200-028-5
	Siklofosfamid Siklofosfamid monohidrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

içerir.

Diğer uygun pozitif kontrol maddeleri kullanılabilir. Mevcut olduğu durumlarda, kimyasal sınıfla ilişkili pozitif kontrol kimyasallarının üzerinde durulmalıdır.

Muamele ortamındaki çözücü veya taşıyıcıyı tek başına içeren ve kültür ile aynı şekilde muamele edilmiş negatif kontroller, her toplama zamanında teste dahil edilmelidir. Ayrıca, geçmişe yönelik kontrol verileri sağlığa zararlı veya mutajenik etkilerin seçilen çözücüyle meydana geldiğini göstermediği sürece muamele edilmemiş kontroller de kullanılmalıdır.

1.4.3. İşlem

1.4.3.1. Test maddesiyle muamele

Çoğalan hücreler test maddesiyle metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda muamele edilirler. Lenfositlerin muamele edilmesi, mitojenik uyarılmasından yaklaşık 48 saat sonra başlatılmalıdır.

1.4.3.2.

İki seri kültür, normalde her derişimde kullanılmalıdır ve negatif/çözücü kontrol kültürleri için kesinlikle tavsiye edilirler. Daha önceki verilere dayanılarak, (iki seri) kültürler arasında çok az değişimin gösterilebildiği durumlarda (13)(14), bu durum her bir derişim için tekli kültür kullanımı kabul edilebilir. Gaz veya uçucu maddeler, kapalı kültür kaplarının içinde olduğu gibi uygun yöntemlerle test edilmelidirler (15)(16).

1.4.3.3. Kültür toplama zamanı

İlk deneyde hücreler metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda, 3-6 saat arasında test maddesine maruz kalırlar ve muamele edildikten sonra yaklaşık 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğuna eşit bir sürede örneklenirler. (12). Eğer bu protokol metabolik aktivasyonun hem varlığında hem de yokluğunda negatif sonuçlar verirse, aktivasyon olmadan ve yaklaşık 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğunda bir süreye eşit sürede örnekleyinceye kadar, sürekli muamele edilerek ilave bir deney yapılmalıdır. Belli kimyasallar 1,5 hücre döngüsü uzunluğundan daha uzun bir uygulama/örnekleme süresin daha kolayca belirlenebilir. Metabolik aktivasyonlu negatif sonuçların vaka vaka teyit edilmesi gerekir. Negatif sonuçların teyit edilmesine gerek duyulmayan böyle durumlarda, gerekçe sağlanmalıdır.

1.4.3.4. Kromozom hazırlama

Genellikle toplamadan bir-üç saat önce hücre kültürleri, kolsemid veya kolşisinle muamele edilirler. Her bir hücre kültürü toplanır ve kromozomların hazırlaması için ayrı ayrı işleme tabi tutulur. Kromozomların hazırlaması, hücrelerin hipotonik muameleden geçmesi, sabitlenmesi ve boyanması aşamalarını içerir.

1.4.3.5. Analiz

Negatif ve pozitif kontrollere ait olanlar da dahil bütün lamlar, mikroskobik analizden önce bağımsız olarak kodlanmalıdır. Sabitleme işlemi genellikle metafaz hücrelerinin kırılarak kromozom kaybetmesiyle sonuçlansa da sayılan hücreler bütün hücre tipleri için ± 2 model sayısına eşit sentromer içermelidir. Mümkünse, derişim ve kontrol başına çiftliler arasında eşit olarak bölünmüş en az 200 düzgün dağılmış metafaz sayılmalıdır. Bu sayı daha yüksek sayıda bozukluk gözlendiğinde düşürülebilir.

Her ne kadar bu testin amacı yapısal kromozom bozukluklarını belirlemek olsa da, poliploidi ve endoreduplikasyon görüldüğünde kaydedilmeleri önemlidir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların işlenmesi

Deneysel birim hücre olduğundan yapısal kromozom bozukluğuna sahip hücrelerin yüzdeler hesaplanmalıdır. Deneysel ve kontrol kültürler için farklı tipteki yapısal kromozom bozuklukları sayı ve tekrarlanma sıklıkları ile birlikte listelenmelidir. Boşluklar ayrıca kaydedilir ve rapor edillir ancak genellikle toplam bozukluk sıklığında yer almazlar.

Belli başlı bozukluk deneylerindeki tüm muamele edilen kültürler ve negatif kontrol kültürler için sitotoksisitenin eş zamanlı ölçümleri ayrıca kaydedilmelidir.

Kültürlerle ilgili veriler ayrı ayrı sağlanmalıdır. İlaveten, bütün veriler tablo halinde özetlenmelidir. Net bir pozitif cevabın doğrulanmasına gerek yoktur. Belirsiz sonuçlar ilave testlerle, tercihen deneysel koşullar modifiye edilerek, netleştirilmelidir. Negatif sonuçların teyit edilmesi ihtiyacı 1.4.3.3'te tartışılmıştır. Takip eden deneylerde çalışma parametrelerinin modifikasyonu, değerlendirilen koşulların aralıklarının genişletilmesi, üzerinden düşünülmelidir. Derişim aralıkları ve metabolik aktivasyon koşulları değişiklik yapılabilecek çalışma parametreleri arasındadır.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Pozitif sonuç tayin etmek için derişime bağlı artış veya kromozomu bozulmuş hücrelerin sayısında tekrar eden artış gibi bazı ölçütler vardır. Sonuçlar ilk önce biyolojik açıdan değerlendirilmelidir. İstatistiksel yöntemler, test sonuçlarını değerlendirirken yardımcı olarak kullanılabilir (3)(13). İstatistiksel anlamlılık pozitif bir cevap için tek belirleyici etken olmamalıdır.

Poliploid hücre sayısındaki artış test maddesinin mitotik süreci inhibe etme ve sayısal kromozomları harekete geçirme potansiyeli olduğuna işaret edebilir. Endoredublikasyonlu kromozomlu hücrelerin sayısındaki artış test maddesinin hücre döngüsünün devamını inhibe etme potansiyeli olduğunu gösterir(17)(18). Yukarıdaki ölçütleri karşılamayan sonuçları olan bir test maddesinin bu sistemde mutajenik olmadığı düşünülür.

Her ne kadar pek çok deney açık pozitif ya da negatif sonuçlar verecekse de, nadir durumlarda veri kümeleri test maddesinin aktivitesi hakkında net bir karar verilmesine engel olabilir. Sonuçlar deneyin tekrarlanma sayısından bağımsız olarak şüpheli ve belirsiz olabilir.

İn vitro kromozom bozukluk testinden elde edilen pozitif sonuçlar, test maddesinin kültürlenmiş memeli somatik hücrelerinde yapısal kromozom bozukluğuna yol açtığına işaret eder. Negatif sonuçlar test koşulları altında test maddesinin kültürlenmiş memeli somatik hücrelerinde kromozom bozukluğuna yol açmadığına işaret eder.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Çözücü/Taşıyıcı
- taşıyıcı seçimi için gerekçe;
- eğer biliniyorsa, test maddesinin çözücü/taşıyıcı içindeki çözünürlüğü ve kararlılığı;

Hücreler:
- hücrelerin kaynağı ve türü;
- karyotip özellikleri ve kullanılan hücre tipinin uygunluğu;
- eğer uygulanabiliyorsa, mikoplazmanın yokluğu;
- hücre döngüsü uzunluğu bilgisi;
- kan verenlerin cinsiyeti, tam kan veya ayrılan lenfositler, kullanılan mitojen;
- uygulanabiliyorsa, parça sayısı;
- uygulanabiliyorsa, hücre kültürü elde etme yöntemleri;
- kromozomların tipik sayısı (verilen bir hücre dizisindeki her bir hücrenin kromozomlarının toplam sayısı)

Test koşulları:
- metafaz-durdurucu maddelerin tanımlanması, derişimi ve hücrenin maruz kalma süresi;
- derişimler ve içerilen kültür sayısı için gerekçe örneğin, varsa, sitotoksisitesi verileri ve çözünürlük sınırlamaları;
- ortamın bileşimi, uygulanabiliyorsa CO2 derişimi;
- test maddesinin derişimi;
- taşıyıcının ve eklenen test maddesinin hacmi;
- inkübasyon sıcaklığı;
- inkübasyon süresi;
- muamele süresi;
- eğer uygunsa, ekim sırasındaki hücre yoğunluğu;
- kabul edilebilirlik kriteri de dahil, metabolik aktivasyonun türü ve bileşimi;
- pozitif ve negatif kontroller;
- lam hazırlama yöntemleri;
- skorlamak ve derecelendirmek için kriterler;
- analiz edilen metafaz sayısı;
- toksisite ölçümleri için yöntemler;

- çalışmaların negatif, pozitif veya belirsiz olup olmadığının anlaşılma ölçütleri

Sonuçlar:
- toksiste belirtileri, örneğin, akıcı olmama derecesi, hücre döngüsü verileri, hücre sayımları, mitotik indeks;
- çökelme belirtileri;
- eğer belirlenebiliyorsa, muamele ortamının ozmolalite ve pH verileri;
- bozukluk için tanımlar, gaplar dahildir;
- hem muamele edilen hem de kontrol kültürler için ayrı ayrı kromozom bozukluğu olan hücre sayısı ve kromozom bozukluğu tipi;
- Eğer görülebiliyorsa, plodideki değişikler;
- doz/cevap ilişkisi, mümkün yerlerde;
- varsa, istatistiksel analizler;
- eş zamanlı negatif (çözücü/taşıyıcı) ve pozitif kontrol verileri
- tarihsel negatif (çözücü/taşıyıcı) ve pozitif kontrol verileri, aralık, ortalama ve standard sapmalarla birlikte

Sonuçların tartışılması.

Yorumlar

4. KAYNAKLAR

(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, 427-432.

(3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl.10), 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, 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, 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, 347-364.

(7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173-215.

(8) Natarajan, A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by

Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 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, 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, 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 In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312, 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, 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.

(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, 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

B.11 MUTAJENİTE - İN VİVO MEMELİ KEMİK İLİĞİ KROMOZOM BOZUKLUĞU TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 475, Memeli Kemik İliği Kromozom Bozukluğu Testi (1997)'nin tekrarıdır.

1.1. Giriş

Canlı organizmada (In vivo) memeli kromozomal bozukluk testi, hayvanların, genellikle de kemirgenlerin kemik iliklerinde test maddesiyle uyarılmış yapısal kromozom bozukluklarının belirlenmesinde kullanılır (1)(2)(3)(4). Yapısal bozukluklar kromozom veya kromatid olarak iki tip olabilir. Poliploididekı artış, kimyasalın sayısal bozuklukları uyarma potansiyeli olduğuna işaret eder. Kimyasal mutajenlerin çoğuyla kromatid tipi bozukluklar uyarılır, ancak kromozom tipi bozukluklar da meydana gelir. Kromozom mutasyonları ve buna bağlı olaylar insandaki pek çok genetik hastalığın nedenidir ve onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde değişikliklere neden olan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların, insanlar ve deney hayvanlarında kansere yol açtığına dair önemli kanıtlar mevcuttur.

Bu testte rutin olarak kemirgenler kullanılır. Kemik iliği bu testteki hedef dokudur, damarlı bir doku olduğundan ve döngüsünü hızlı bir şekilde tamamlayan hücre popülasyonu içerdiğinden kolayca izole edilip, işlenebilir. Diğer türler ve hedef dokular bu yöntemin konusu değildir.

Bu kromozom bozukluk testi, özellikle, her ne kadar tüm bunlar türler ve dokular arasında çeşitlilik gösterse de, mutajenik zararın ve buna bağlı olarak in vivo metabolizma etkenlerinin, farmakokinetiğin ve DNA onarım sürecinin değerlendirilmesini amaçlar. Bir canlı organizma içindeki (in vivo) test ayrıca, yapay ortamdaki (in vitro) testlerle belirlenen mutajenik etkilerin daha sonraki araştırmaları için faydalıdır.

Eğer test maddesinin veya reaktif metabolitinin hedef dokuya ulaşamadığına dair kanıt mevcutsa, bu testi kullanmak uygun değildir.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Kromatid-tipi bozukluk: Yapısal kromozom hasarı, tekli kromatid kırılması veya kromatidler arası kırılma ve birleşme olarak ifade edilir.

Kromozom-tipi bozukluk: Yapısal kromozom hasarı, özdeş bir konumdaki her iki kromatitin kırılması veya kırılması ve birleşmesi olarak ifade edilir.

İki katına çıkarma (Endoreduplikasyon): DNA çoğalmasının S fazından sonraki bir işlemdir, çekirdek mitoza uğramaz fakat başka bir S fazı süreci başlatır. Sonuç 4, 8, 16, . . .kromatidli kromozomlardır.

Boşluk: bir kromatidin genişliğinden daha küçük genişlikte ve en az yanlış dizilimli kromatid bir akromatik doku bozulmasıdır.

Sayısal bozukluk: kullanılan hücrelerin normal kromozom sayısındaki değişim

Poliploidi: haploid (tek kromozomlu yapı) kromozom sayısının (n) diploid sayıdan başka bir sayıyla çarpımı (ör. 3n, 4n.....).

Yapısal bozukluk: Kromozom yapısında, hücre bölünmesinin metafaz aşamasının mikroskobik incelemeyle saptanabilen değişikliktir; delesyonlar, fragmanlar, ara ve iç değişiklikler olarak gözlenir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Hayvanlar test maddesine uygun bir yolla maruz bırakılırlar ve muamele sonrasındaki uygun zamanlarda feda edilirler. Bu durumun öncesinde hayvanlar bir metafaz-durdurucu madde ile (kolşisin veya Kolsemid) muamele edilir. Daha sonra kemik iliği hücrelerinden kromozom hazırlıkları yapılır ve boyanır, kromozom bozuklukları için metafaz hücreleri analiz edilir.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hazırlıklar

1.4.1.1. Hayvan türünün seçimi

Her ne kadar uygun herhangi bir memeli türü kullanılabilirse de sıçanlar, fareler ve Çin hamsterları yaygın olarak kullanılır. Genç, sağlıklı, erişkin hayvanların yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşları kullanılmalıdır. Çalışmanın başlangıcında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin % 20'sini geçmemelidir.

1.4.1.2. Barınma ve beslenme koşulları

Genel koşullar, Genel Giriş Kısım B'de belirtildiği şekilde uygulanır, nem % 50–60 arasında olmalıdır.

1.4.1.3. Hayvanların hazırlanması

Sağlıklı genç erişkin hayvanlar rastgele kontrol ve muamele gruplarına ayrılırlar. Kafesler yerleştirilmelerinden kaynaklanacak olası etkileri en az indirecek şekilde yerleştirilirler. Hayvanlar ayrı ayrı kimliklendirilirler. Hayvanlar en az beş gün öncesinden laboratuvar koşullarına alıştırılırlar.

1.4.1.4. Dozların hazırlanması

Eğer uygunsa, hücreler muamele edilmeden önce, katı test maddeleri uygun çözücüler veya taşıyıcılar içinde çözülmeli veya askıda kalmalı ve seyreltilmelidir.. Sıvı test maddeleri muameleden önce test sistemine doğrudan eklenebilirler veya seyreltilebilirler. Kararlılığıyla ilgili veriler saklanmasının uygun olduğunu göstermedikçe test maddesinin taze hazırlanmış olanları uygulanmalıdır.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Çözücü/Taşıyıcı

Çözücü/taşıyıcı kullanılan doz seviyelerinde toksik etki meydana getirmemelidir ve test maddesiyle kimyasal reaksiyona gireceğinden şüphe duyulmamalıdır. Eğer çok iyi bilinen çözücüler/taşıyıcılar dışındakiler kullanılırsa içerikleri uyumlu olduklarını gösteren verilerle desteklenmelidir. Uygun olan her yerde önce sulu çözelti/taşıyıcı kullanılmasının düşünülmesi tavsiye edilir.

1.4.2.2. Kontroller

Eş zamanlı pozitif ve negatif (çözücü/taşıyıcı) kontroller, her bir cinsiyet için her bir deneyde de yer almalıdır. Test maddesiyle muamele haricinde, kontrol grubundaki hayvanlar, muamele grubundaki hayvanlarla eşit şartlarda tutulmalıdırlar.

Pozitif kontroller, arka planda belirlenebilen artışlar göstermesi beklenen maruz kalma seviyelerinde canlı organizma içinde (in vivo) yapısal bozukluklar meydana getirmelidir. Pozitif kontrol dozları etkilerin açıkça görülebileceği şekilde seçilmelidir, fakat işaretli lamların özdeşliği okuyucu tarafından hemen ortaya çıkarılmaz. Test maddesinin uygulandığından daha farklı şekilde uygulanan pozitif kontrol kabul edilebilirdir ve sadece tek seferde örnekleme yapılır. Mevcut olduğu durumlarda, kimyasal sınıfla ilişkili pozitif kontrol kimyasallarının kullanımı üzerinde durulmalıdır.

Pozitif kontrol madde örnekleri :

Madde	CAS No.	EINECS No.
Etil metansülfonat	62-50-0	200-536-7
Etil nitroz üre	759-73-9	212-072-2
Mitomisin C	50-07-7	200-008-6
Siklofosfamid Siklofosfamid monohidrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Tek başına çözücüyle veya taşıyıcıyla muamele edilmiş olan ve bunun dışında uygulama gruplarıyla aynı şekilde muamele edilen negatif kontroller, hayvanlar arasındaki kabul edilebilir çeşitlilik ve kromozom bozukluklarına sahip hücre sıklıkları, geçmişe yönelik kontrol verilerden elde edilemediği sürece, her örnekleme zamanı için dâhil edilmelidir. Eğer negatif kontroller için tek bir örnekleme uygulanacaksa, en uygun zaman ilk örnekleme zamanıdır. Ek olarak, seçilen çözücü/taşıyıcı tarafından uyarılmış hiç bir zararlı veya mutajenik etki olmadığını gösteren geçmişe yönelik veya yayınlanmış kontrol verileri yoksa, muamele edilmemiş kontroller de kullanılabilir. .

1.5. İşlem

1.5.1. Hayvanların sayı ve cinsiyetleri

Her bir muamele ve kontrol grubu cinsiyet başına en az 5 analiz edilebilir hayvan içermelidir. Eğer çalışma sırasında aynı tür içi ve aynı maruz kalma yolu uygulanarak yapılan

çalışmalardan elde edilebilir veriler varsa, bu durum cinsiyetler arasında önemli farklılıkların bulunmadığını gösterir, o zaman tek bir cinsiyette test uygulanması yeterli olacaktır.

İnsanlarda kimyasallara maruz kalma cinsiyete özgü olabildiğinden, örneğin bazı farmasötik etkenlerle, test uygun cinsiyetteki hayvanlarla uygulanmalıdır.

1.5.2. Uygulama planı

Test maddeleri tercihen tek işlemde uygulanır. Test maddesi ayrıca büyük hacimli maddenin uygulanmasını kolaylaştırmak amacıyla, örn. aynı gündeki iki muamele birkaç saati geçmeyecek şekilde ayrılabilir, bölünmüş dozlar halinde uygulanabilir. Diğer doz düzeyleri bilimsel olarak gerekçelendirilmelidir.

Örnekler muameleyi takiben bir gün içindeki iki farklı zamanda alınmalıdır. Kemirgenler için muameleyi takip eden ilk örnekleme 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğudur. Test maddesinin alınması ve metabolizması için zamana gerek duyulmasının yanında, test maddesinin hücre döngüsü kinetiği üzerindeki etkileri kromozom bozukluğunu belirlemeleri için gereken en uygun süreyi de etkileyebileceğinden, ilk örnekten 24 saat sonra ikinci bir örnek alınması tavsiye edilir. Eğer doz düzeyleri birden fazla günde uygulanıyorsa, en son muameleden sonra 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğunda, bir örnek alma süresi kullanılmalıdır.

Feda edilmeden önce, hayvanlara uygun dozda metafaz durdurucu madde (ör. Colcemid® veya kolşisin) karın içine enjekte edilir. Daha sonra uygun aralıklarla hayvanlardan örnek alınır. Fareler için bu aralık yaklaşık 3-5 saattir; Çin hamsterları için bu aralık yaklaşık 4-5 saattir. Hücreler kemik iliğinden toplanır ve kromozom bozuklukları için analiz edilirler.

1.5.3. Doz-seviyeleri

Eğer elde hiç uygun veri bulunmadığı için bir aralık bulma çalışması yürütülürse, temel çalışmada kullanılanla aynı laboratuvar, aynı suş, cinsiyet ve muamele düzeyi kullanılarak yürütülmelidir (5). Eğer toksisite varsa, ilk örnek alma zamanı için üç doz kullanılmalıdır. Bu doz seviyeleri maksimumla çok az toksisitenin olduğu veya hiç toksisitenin olmadığı aralığın içinde olmalıdır. Daha sonraki örnek alma zamanında sadece en yüksek dozun kullanılması gerekir. En yüksek doz, toksik belirtilerinin oluşmaya başladığı doz olarak tanımlanır öyle ki daha yüksek doz seviyelerinin, aynı doz uygulama düzeyine dayanarak, ölüme neden olması beklenir. Düşük seviyeli toksik olmayan dozlarda özel biyolojik aktivite gösteren hormonlar ve mitojenler gibi maddeler doz belirleme ölçütlerinde istisna olabilir ve tek başına değerlendirilmelidir. Ayrıca en yüksek doz, kemik iliğinde (ör. Mitotik indekste % 50'den fazla azalma) bazı toksik belirtileri meydana getiren doz olarak da tanımlanabilir.

1.5.4. Sınır testi

Eğer 2000 mg/kg vücut ağırlığı doz seviyeli bir sınır testi tek doz veya aynı günde iki muamele olarak uygulandığında gözlenebilen herhangi bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve eğer yapısal olarak benzer maddelerle ilgili genotoksisite (genetik toksisite) beklenmiyorsa bu durumda üç doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. Uzun süreli çalışmalarda, 14 güne kadar olan muameleler için sınır doz 2000 mg/kg/vücut ağırlığı/gün; 14 günden daha uzun süreli muamelelerde 1000 mg/vücut ağırlığı/gün'dür. İnsanda beklenen maruz kalma, sınır testinde daha fazla dozun kullanılması gerektiğine işaret edebilir.

1.5.5. Dozların uygulanması

Test maddesi genellikle gavaj yöntemi kullanılarak sonda ile beslemeyle veya mideye uygun bir elastik boru sokulmasıyla veya karın içine enjeksiyonla uygulanır. Diğer maruz kalma yolları gerekçelendirildiklerinde uygun olabilir. Sonda ile veya enjeksiyonla tek seferde uygulanabilecek olan maksimum sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim 2 ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir. Bu değerden daha yüksek hacimler gerekçelendirilmelidir. Normalde daha yüksek konsantrasyonlarda daha kötü etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için konsantrasyonun tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla test hacmindeki değişkenlik en aza indirilir.

1.5.6. Kromozom hazırlanması

Feda edilmelerden hemen sonra kemik iliği elde edilir, hipotonik çözeltiye maruz bırakılır ve sabitlenir. Daha sonra hücreler lamların üzerine yayılır ve boyanırlar.

1.5.7. Analiz

Mitotik indeks pozitif kontroller de dâhil muamele edilmiş tüm hayvanlar ve muamele edilmemiş negatif kontrol hayvanları içinde hayvan başına en az 1000 hücrede sitotoksisitenin (hücre toksisitesi) bir ölçüsü olarak belirlenmelidir.

Her hayvan için en az 100 hücre analiz edilmelidir. Bu sayı yüksek sayıda bozukluk gözlendiği takdirde artırılabilir. Pozitif ve negatif kontrollerinkiler de dâhil tüm lamlar mikroskobik analizden önce ayrı ayrı işaretlenmelidir. Çünkü lam hazırlama işlemleri genellikle kromozom kaybıyla birlikte metafaz kısmının kırılmasıyla sonuçlanır, bu yüzden sayılan hücreler 2n ±2 sayısına eşit sayıda sentromer içermelidir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Hayvanlara ait veriler ayrı ayrı çizelge haline getirilmelidir. Deneysel birim hayvandır. Her bir hayvan için hücre sayısı işaretlenir, hücre başına düşen bozukluk sayısı, yapısal kromozom bozukluk(ları) ile hücre yüzdesi değerlendirilmelidir. Farklı tipteki yapısal kromozom bozuklukları sayılarıyla ve sıklıklarıyla kontrol ve muamele grupları için listelenmelidir. Boşluklar ayrıca kaydedilir ve raporlanır fakat genelde toplam bozukluk sıklığında yer almazlar. Eğer cinsiyetler arasında cevaplar olduğuna dair hiç kanıt yoksa, istatistiksel analiz için her iki cinsiyetten elde edilen veriler birleştirilebilir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Pozitif sonuç tayin etmek için örneğin kromozom bozukluğu olan hücrelerin bağıl sayısındaki doza bağlı artış veya tek bir doz grubunda, tek bir örnek alma zamanındaki kromozom bozukluğu olan hücrelerin sayısındaki net artış gibi bazı ölçütler vardır. Sonuçlar ilk önce biyolojik açıdan değerlendirilmelidir. İstatistiksel yöntemler, test sonuçlarını değerlendirirken yardımcı olarak kullanılabilir (6). İstatistiksel anlamlılık pozitif bir cevap için tek belirleyici

etken olmamalıdır. Şüpheli sonuçlar ilave testlerle, tercihen deney koşullarının düzeltilmesiyle, netleştirilmelidir.

Poliploididekı artış test maddesinin sayısal kromozom bozukluklarını uyarma potansiyeli olduğuna işaret edebilir. Endoredublikasyondaki artış test maddesinin hücre döngüsünün ilerlemesini engelleme potansiyeli olduğuna işaret eder (7)(8). Yukarıdaki kriterlere uymayan bir test maddesinin, bu testte mutajenik olmadığı düşünülür.

Her ne kadar pek çok deney açıkça pozitif ve negatif sonuçlar verecekse de, nadir durumlarda veri kümeleri test maddesinin etkinliği hakkında net bir karara varılmasına engel olacaktır. Sonuçlar uygulanan deneylerin sayısından bağımsız olarak belirsiz veya tartışmaya açık kalabilir.

Canlı organizmada(in vivo) kromozom bozukluğu testlerinden elde edilen pozitif sonuçlar bir maddenin test edilen türün kemik iliğindeki kromozom bozukluğunu uyardığını gösterir. Negatif sonuçlar, test koşulları içinde, test maddesinin test edilen türün kemik iliğindeki kromozom bozukluğuna sebep olmadığını gösterir.

Test maddesinin veya metabolitinin genel dolaşıma veya belirli biçimde hedef dokuya (örneğin, sistemik toksisite) ulaşma olasılığı tartışılmalıdır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Çözücü/Taşıyıcı
- taşıyıcı seçimi için gerekçe;
- eğer biliniyorsa, test maddesinin çözücü/taşıyıcı içindeki çözünürlüğü ve kararlılığı;

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ suş;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, diyet. vs.;
- testin başında her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı, her bir grup için vücut ağırlığı aralığı, ortalama ve standart sapma dâhildir;

Test koşulları:
- pozitif ve negatif (taşıyıcı/çözücü) kontrolleri;
- eğer yapıldıysa, aralık-bulma çalışmaları verileri;
- doz seçimi için gerekçe;
- test maddesi hazırlanmasıyla ilgili detaylar;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- uygulama yolu için gerekçe;
- eğer uygulanabiliyorsa, genel dolaşıma veya hedef dokuya ulaşan maddelerin doğruluğunu kanıtlamak için kullanılan yöntemler;

- eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi konsantrasyonunun (ppm) mevcut doza (mg/kg vücut ağırlığı/gün) çevrilmesi;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar;
- muamele ve örnek alma planıyla ilgili detaylı tanım;
- toksisite ölçümü yöntemleri;
- metafaz durdurucu maddelerin kimlikleri, konsantrasyonları ve muamele süreleri;
- lam hazırlama yöntemleri;
- bozuklukları sayma ölçütleri;
- hayvan başına analiz edilen hücre sayısı;
- çalışmaları pozitif, negatif ve belirsiz olarak ayırma ölçütleri.

Sonuçlar:
- toksisite belirtileri;
- mitotik indeks;
- her bir hayvan için ayrı ayrı verilen abrerasyon tipi ve sayısı;
- grup başına düşen toplam bozukluk sayısı, ortalama ve standart sapmayla birlikte;
- grup başına düşen kromozomu bozuk hücre sayısı, ortalama ve standart sapmayla birlikte;
- eğer görülebiliyorsa, plodideki değişiklikler;
- uygun yerlerde, doz cevap ilişkisi;
- eğer varsa, istatistiksel analiz;
- eş zamanlı negatif kontrol verileri;
- geçmişe yönelik negatif kontrol verileri, aralık, ortalama ve standart sapmayla birlikte;
- eş zamanlı pozitif kontrol verileri.

Sonuçların tartışılması

Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

(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., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures.UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. CambridgeUniversity Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the in Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, 305-312.

(5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson- Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

B.12 MUTAJENİTE – IN VIVO MEMELİ ERİTROSİTMİKROÇEKİRDEK TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 474, Memeli Eritrosit Mikroçekirdek Testi (1997)'ne eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Memeli in vivo mikroçekirdek testi, eritroblastların (bir alyuvar tipi) mitotik düzeneğinin veya kromozomların test maddesiyle uyarıldığında ortaya çıkacak hasarları hayvanların, genellikle de kemirgenlerin kemik iliği ve/veya çevresindeki kan hücrelerinden alınan örneklerin analiz edilerek tespit edilmesi için kullanılır.

Mikroçekirdekler içeren yalıtkan kromozom parçalarının veya tam kromozomların oluşmasıyla sonuçlanan mikroçekirdek testinin amacı sitogenetik hasara neden olan maddeleri belirlemektir.

Bir kemik iliği eritroblastı polikromatik eritrosit geliştirdiğinde, esas çekirdek çıkarılır, oluşan mikroçekirdek arkada, aksi takdirde çekirdeksiz sitoplazmada kalabilir. Mikroçekirdeklerin gözle görülmesi, bu hücrelerde esas çekirdek olmadığından kolaylaştırılmıştır. Muamele edilen hayvanlardaki mikroçekirdekli polikromatik eritrosit sıklığındaki artış uyarılmış kromozom hasarlarının göstergesidir.

Bu testte kemirgenlerin kemik ilikleri kullanılır çünkü polikromatik eritrositler bu dokuda üretilirler. Periferal kandaki mikroçekirdekli olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin ölçümü, dalağın mikroçekirdekli eritrositleri uzaklaştırmadaki yetersizliğinin gösterildiği veya yapısal veya sayısal kromozom bozukluklarına neden olan ajanları tayin edecek duyarlılığa sahip türlerde aynı şekilde kabul edilir. Mikroçekirdekler bir dizi ölçütle ayrılabilir. Bu ölçütler mikroçekirdekler içindeki kinetokor veya sentromerik DNA'nın varlığının ve yokluğunun belirlenmesini içerir. Mikroçekirdekli olgunlaşmamış (polikromatik) eritrosit sıklığı sonlanma noktasıdır. Hayvanlar 4 veya daha fazla hafta boyunca sürekli olrak muamele edildiklerinde, belli sayıda olgun eritrosit arasından, mikroçekirdekler içeren periferal kanda olgunlaşmış (normokromatik) eritrosit sayısı da yöntemin son noktası olarak kullanılabilir

Bu memeli in vivo mikroçekirdek testi özellikle canlı organizmada (in vivo) metabolizma, farmakokinetik ve DNA-onarım süreci faktörlerinin, her nekadar hepsi türler, dokular ve genetik sonlanma noktaları arasında farklılık gösterse de, üzerinde durulmasına olanak sağlayan mutajenik zararların değerlendirilmesiyle ilgilidir. Bir canlı organizmada (in vivo) yöntem, yapay ortamda (in vitro) sistemde tespit edilen mutajenik etkilerin daha ileri araştırmaları için de ayrıca yararlıdır. Eğer test maddesinin veya reaktif metabolitinin hedef dokuya ulaşmayacağına dair kanıt varsa bu testin kullanımı uygundeğildir.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Sentromer (Kinetokor): Hücre bölünmesi sırasında iğ iplikçiklerin tutuntuğu kromozom bölgesidir, kardeş kromozomların, kardeş hücre kutuplarına doğru düzenli hareket etmesini sağlar.

Mikroçekirdekler:, Asıl çekirdekten ayrı ve aynı zamanda asıl çekirdeğe eklenmiş olan küçük çekirdeklerdir, mitozun telofaz safhasında yalıtkan kromozom parçalarından veya tüm kromozomdan üretilirler.

Normokromatik eritrosit: Olgunlaşmış eritrositin, ribozomu yoktur ve olgunlaşmamış, polikromatik eritrositten ribozom seçici boyalarla ayrılabilir.

Polikromatik eritrosit: Olgunlaşmamış eritrosittir, gelişmenin ara safhasıdır, hala ribozomu olduğundan olgunlaşmış, normokromatik eritrositten ribozom seçici boyalarla ayrılabilir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Hayvanlar test maddesine uygun bir yolla maruz kalırlar. Eğer kemik iliği kullanılmışsa hayvanlar muameleden sonraki uygun zamanlarda feda edilirler, kemik iliği alınır, örnekler hazırlanır ve boyanır (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Periferal kan kullanılmışsa, kan muameleden sonraki uygun zamanlarda toplanır, lam üzerine yayılmış örnekleri hazırlanır ve boyanır.(4)(8)(9)(10). Periferal kandaki çalışmalar için, son maruz kalma ve hücre toplanması arasında olabildiğince kısa bir süre geçmelidir. Örnekler mikroçekirdek varlığı için analiz edilirler.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hazırlıklar

1.4.1.1. Hayvan türlerinin seçimi

Her ne kadar uygun herhangi bir memeli türü kullanılabilirse de, eğer kemik iliği kullanılmışsa, fareler veya sıçanlar tavsiye edilir. Periferal kan kullanıldığında fare tavsiye edilir. Ancak, herhangi bir uygun memeli türü, yani dalağın mikroçekirdekli eritrositleri çıkarmadığı bir tür veya yapısal veya sayısal kromozom bozukluklarına neden olan maddeleri tespit etmek için yeterli duyarlılığı gösteren bir tür, kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan genç, sağlıklı hayvanların laboratuvar suşlar kullanılmalıdır. Çalışmanın başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin ±% 20'sini geçmemelidir.

1.4.1.2. Barınma ve beslenme koşulları

Genel koşullar, Bölüm B Genel Giriş (B)'de belirtildiği şekilde uygulanır, nem % 50–60 arasında olmalıdır.

1.4.1.3. Hayvanların hazırlanması

Sağlıklı genç erişkin hayvanlar rasgele kontrol ve muamele gruplarına ayrılırlar. Kafesler yerleştirilmelerinden kaynaklanacak olası etkileri en az indirecek şekilde yerleştirilirler.

Hayvanlar eşsiz olarak kimliklendirilirler. Hayvanlar en az beş gün öncesinden laboratuar koşullarına alıştırılırlar.

1.4.1.4. Dozların hazırlanması

Eğer uygunsa hücreler muamele edilmeden önce, katı test maddeleri uygun çözücüler veya taşıyıcılar içinde çözülmeli veya askıda kalmalı ve seyreltilmelidir. Sıvı test maddeleri muameleden önce test sistemine doğrudan eklenebilirler veya seyreltilebilirler. Kararlılığıyla ilgili veriler saklanmasının kabul edilebilirliğini göstermedikçe test maddesinin taze hazırlanmış olanları uygulanmalıdır.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Çözücü/taşıyıcı

Çözücü/taşıyıcı kullanılan doz seviyelerinde toksik etki meydana getirmemelidir ve test maddesiyle kimyasal reaksiyona gireceğinden şüphe duyulmamalıdır. Eğer çok iyi bilinen çözücüler/taşıyıcılar dışındakiler kullanılırsa içerikleri uyumlu olduklarını gösteren verilerle desteklenmelidir. Uygun olan her yerde önce sulu çözelti/taşıyıcı kullanılmasının düşünülmesi tavsiye edilir.

1.4.2.2. Kontroller

Eş zamanlı pozitif ve negatif (çözücü / taşıyıcı) kontroller, her bir cinsiyet için her bir deneyde de yer almalıdır. Test maddesiyle muamele haricinde, kontrol grubundaki hayvanlar muamele grubundaki hayvanlarla eşit şartlarda tutulmalıdır.

Pozitif kontroller arka planda tespit edilebilir artışlar göstermesi beklenen maruz kalma seviyelerinde canlı organizma içinde (in vivo) mikroçekirdekler meydana getirmelidir. Pozitif kontrol dozları, etkilerin açıkça görülebileceği şekilde seçilmelidir, fakat işaretli lamların özdeşliği okuyucu tarafından hemen ortaya çıkarılmaz. Test maddesinin uygulandığından daha farklı şekilde uygulanan pozitif kontrol kabul edilebilirdir ve sadece tek seferde örnekleme yapılır. Mevcut olduğu durumlarda, kimyasal sınıfla ilişkili pozitif kontrol kimyasallarının kullanımı üzerinde durulmalıdır.

Pozitif kontrol madde örnekleri :

Madde	CAS No.	EINECS No.
Etil metil sülfonat	62-50-0	200-536-7
N-Etil-N-nitrozo üre	759-73-9	212-072-2
Mitomisin C	50-07-7	200-008-6
Siklofosfamid Siklofosfamid monohidrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Çözücüyle muamele edilmiş veya sadece taşıyıcı olan ve bunun dışında uygulama gruplarıyla aynı şekilde muamele edilen negatif kontroller, hayvanlar arasındaki kabul edilebilir çeşitlilik ve kromozomu bozuk hücrelerin sıklıkları geçmişe yönelik kontrol verilerinden elde edilemediği sürece, her örnek alma zamanı için dahil edilmelidir. Eğer negatif kontroller için tek örnek alımı uygulanırsa, en uygun zaman ilk örnek alma zamanıdır. Ek olarak, seçilen

çözücü/taşıyıcı tarafından uyarılmış hiç bir zararlı veya mutajenik etki olmadığını gösteren tarihsel veya yayınlanmış kontrol verileri yoksa işlenmemiş kontroller dahi kullanılabilir.

Eğer periferal kan kullanılmışsa, daha önceden muamele edilmiş örnek eş zamanlı negatif kontrol olarak da ayrıca kabul edilebilir fakat sonuç verileri geçmişe yönelik kontrol için beklenen aralıkta olduğunda sadece kısa periferal kan çalışmalarında (ör. 1–3 muamele) bu durum söz konusudur.

1.5. İşlem

1.5.1. Hayvanların sayı ve cinsiyetleri

Her bir muamele ve kontrol grubu cinsiyet başına en az 5 analiz edilebilir hayvan içermelidir (11). Eğer çalışma sırasında aynı tür için aynı maruz kalma yolu uygulanarak yapılan çalışmalardan elde edilebilir veriler varsa, bu durum cinsiyetler arasında önemli farklılıkların bulunmadığını gösterir, o zaman tek bir cinsiyette test uygulanması yeterli olacaktır.

İnsanlarda kimyasallara maruz kalma cinsiyete özgü olabildiğinden, örneğin bazı farmasötik etkenlerle, test uygun cinsiyetteki hayvanlarla uygulanmalıdır.

1.5.2. Uygulama Planı

Tavsiye edilen standart bir muamele programı yoktur (ör. 24 saatlik aralıklarla 1, 2 veya daha fazla muamele). Uzatılmış doz rejimlerinden alınan örnekler, bu çalışma için pozitif etki gösterdiği sürece, veya negatif çalışmalar için toksisite gösterdiği veya sınır doz kullanıldığı sürece kabul edilebilirdir ve doz uygulamasına örnek alma zamanına kadar devam edilir. Test maddesi ayrıca büyük hacimli maddelerin uygulanmasını kolaylaştırmak için bölünmüş dozlar halinde de (örn. aynı günde verilmeleri arasındaki süre birkaç saati geçmeyen iki muamele şeklinde) uygulanabilir.

Test iki şekilde uygulanabilir:

(a) Hayvanlar test maddesiyle bir kere muamele edilirler. Kemik iliği örnekleri en az iki defa alınır, muameleden en az 24 saat sonra fakat 48 saati geçmeyen sürede, örnekler arası uygun aralıklarla örnek alınmasına başlanır. Örnek alınmasına uygulamadan sonra 24 saat geçmeden başlanması gerekçelendirilmelidir. Periferal kan örnekleri en az iki defa alınır, muameleden en az 36 saat sonra başlanır, ilk örneğin alınmasını takiben uygun aralıklarla fakat 72 saati geçmeyen sürede alınmalıdır. Örnek alma zamanında pozitif cevaba rastlanırsa, ilave örnek alınmasına gerek yoktur.

(b) Eğer 2 veya daha fazla günlük uygulama yapılıyorsa (ör. 24 saat aralıklarla iki veya daha fazla muamele), örnekler kemik iliği için en sonuncu muameleyi takiben 18 ve 24. saatler arasında bir kere ve periferal kan için de en sonuncu muameleyi takiben 36 ve 48. saatler arasında alınmalıdır (12).

Diğer örnek alma zamanları da ilgili yerlede ilave olarak kullanılabilir.

1.5.3. Doz seviyeleri

Eğer elde hiç uygun veri bulunmadığı için bir aralık bulma çalışması yürütülürse, temel çalışmada kullanılanla aynı laboratuvar, aynı ırk, cinsiyet ve muamele düzeyi kullanılarak yürütülmelidir (13). Eğer toksisite varsa, ilk örnek alma zamanı için üç doz kullanılır. Bu doz seviyeleri maksimumla çok az toksisitenin olduğu veya hiç toksisitenin olmadığı aralığın içinde olmalıdır. Daha sonraki örnek alma zamanında sadece en yüksek dozun kullanılması gerekir. En yüksek doz, toksik belirtilerinin oluşmaya başladığı doz olarak tanımlanır şöyle ki daha yüksek doz seviyelerinin, aynı doz uygulama düzeyine dayanarak, ölüme neden olması beklenir. Düşük seviyeli toksik olmayan dozlarda özel biyolojik aktiflik gösteren hormonlar ve mitojenler gibi maddeler doz belirleme ölçütlerinde istisna olabilir ve tek başına değerlendirilmelidir. Ayrıca en yüksek doz kemik iliğinde (örneğin, kemik iliği veya periferal kandaki toplam eritrositteki olgunlaşmamış eritrosit sayısı) bazı toksik belirtileri meydana getiren doz olarak da tanımlanabilir.

1.5.4. Sınır testi

Eğer 2000 mg/kg vücut ağırlığı doz seviyeli bir sınır testi tek doz veya aynı günde iki muamele olarak uygulandığında gözlenebilen herhangi bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve eğer yapısal olarak benzer maddelerle ilgili genotoksisite beklenmiyorsa bu durumda üç doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. Uzun süreli çalışmalarda, 14 güne kadar olan muameleler için sınır doz 2000 mg/kg/vücut ağırlığı/gün; 14 günden daha uzun süreli muamelelerde 1000 mg/vücut ağırlığı/gün'dür. İnsanda beklenen maruz kalma, sınır testinde daha fazla doz kullanılması gerektiğine işaret edebilir.

1.5.5. Dozların uygulanması

Test maddesi genellikle gavaj yöntemi kullanılarak sonda ile besleme veya mideye uygun bir elastik boru sokulmasıyla veya karın içine enjeksiyonla uygulanır. Diğer işlem yolları gerekçelendirildiklerinde uygun olabilir. Sonda ile besleme veya enjeksiyonla tek seferde uygulanabilecek olan maksimum sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim 2 ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir. Bu değerden daha yüksek hacimler gerekçelendirilmelidir. Normalde daha yüksek konsantrasyonlarda daha kötü etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için konsantrasyonun tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla test hacmindeki değişkenlik en aza indirilir.

1.5.6. Kemik iliği/kan hazırlanması

Kemik iliği hücreleri genellikle feda edilmelerden hemen sonra kalça kemiğinden veya kaval kemiğinden elde edilirler. Yaygın olarak hücreler femür veya kaval kemiğinden uzaklaştırılırlar, hazırlanırlar ve bilinen yöntemlerle boyanırlar. Periferal kan toplardamardan veya diğer uygun kan damarından elde edilir. Kan hücreleri hemen supravital boyama ile boyanırlar (8)(9)(10) veya lam üzerine örnekler yayılır, daha sonra boyanırlar. DNA'ya özgü boyanın [örn. akridin turuncusu (14) veya Hoechst 33258 plus pironin-Y (15)] kullanılması DNA'ya özgü olmayan boya kullanımıyla ilgili işlem hatalarının bazılarını ortadan kaldırabilir. Bu avantaj, geleneksel boyaların (ör. Giemsa) kullanılmasına engel olmaz. Laboratuarlarda mikroçekirdek hazırlanmasında uygun şekilde kullanıldığı gösterilen ilave sistemler [ör. çekirdekli hücreleri uzaklaştırmak için selüloz kolonlar (16)] kullanılabilir.

1.5.7. Analiz

Olgunlaşmamış eritrosit sayısının toplam eritrosit (olgunlaşmamış + olgun) sayısına oranı her bir hayvan için, kemik iliğinde toplamda en az 200, periferal kanda ise 1000 eritrosit sayılarak belirlenir (17). Pozitif ve negatif kontroller de dahil tüm lamlar mikroskobik analizden önce ayrı ayrı işaretlenmelidir. Hayvan başına en az 2000 olgunlaşmamış eritrosit mikroçekirdekli olgunlaşmamış eritrosit oluş sıklığı için sayılırlar. İlave bilgi mikroçekirdekler için olgunlaşmış eritrosit sayılarak elde edilebilir. Lamlar analiz edilirken, olgunlaşmamış eritrositin toplam eritrosite oranı kontrol değerinin %20'sinden az olmamalıdır. Hayvanlar 4 hafta veya daha fazla bir süre sürekli olarak muamele edildiklerinde hayvan başına en az 2000 eritrosit de ayrıca mikroçekirdeklerin oluş sıklığı için sayılabilir. Uygun şekilde düzenlenmiş ve geçerli hale getirilmiş otomatik analiz sistemleri (görüntü analizi ve hücre süspansiyon akış sitometri) elle yapılan değerlendirmelere seçenek olarak kabul edilebilir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Hayvanlarla ilgili veriler ayrı ayrı çizelge halinde sunulmalıdır. Deneysel birim hayvandır. Sayılan olgunlaşmamış eritrosit sayısı, mikroçekirdekli olgunlaşmamış eritrosit sayısı, ve toplam eritrositler arasından olgunlaşmamış olanların sayısı analiz edilen her bir hayvan için ayrı olarak listelenmelidir. Hayvanlar 4 hafta veya daha uzun süre süreki olarak muamele edildiklerinde eğer toplanmışsa, olgunlaşmış eritrosit verileri de ayrıca verilmelidir.Olgunlaşmamış eritrositlerin toplam eritrositlere oranı ve eğer uygulanabilir olduğu düşünülürse mikroçekirdekli eritrosit yüzdesi her bir hayvan için verilir. Eğer cinsiyetler arasında farklı cevaplar olduğuna dair hiç kanıt yoksa istatiksel analiz için her iki cinsiyetten elde edilen veriler birleştirilebilir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Pozitif sonuç tayin etmek için artış mikroçekirdekli hücrelerin sayısındaki doza bağlı artış veya tek bir doz grubunda, tek bir örnek alma zamanında mikroçekirdekli hücrelerin sayısındaki net artış gibi bazı ölçütler vardır. Sonuçlar ilk önce biyolojik açıdan değerlendirilmelidir. İstatistiksel yöntemler, test sonuçlarını değerlendirirken yardımcı olarak kullanılabilir (8)(19). İstatiksel anlamlılık pozitif bir cevap için tek belirleyici etken olmamalıdır. Şüpheli sonuçlar ilave testlerle, tercihen deney koşullarının düzeltilmesiyle netleştirilmelidir.

Sonuçları yukarıdaki ölçütleri karşılamayan bir test maddesinin bu sistemde mutajenik olmadığı düşünülür.

Her ne kadar pek çok deney açıkça pozitif ya da negatif sonuçlar verecekse de, nadir durumlarda veri kümeleri test maddesinin aktifliği hakkında net bir karar verilmesine engel olacaktır. Sonuçlar deneyin tekrarlanma sayısından bağımsız olarak şüpheli ve belirsiz olabilir.

Mikroçekirdek testindeki pozitif sonuçlar maddenin kromozomal hasar veya test türünün eritroblastlarındaki mitotik aygıttaki hasarlar sonucu meydana gelen mikroçekirdekleri

uyardığına işaret eder. Negatif sonuçlar, test koşulları içinde, test maddesinin test türünün olgunlaşmamış eritrositlerindeki mikroçekirdekler oluşturmadığına işaret eder. Test maddesinin veya metabolitinin genel dolaşıma veya belirli biçimde hedef dokuya (örneğin, sistemik toksisite) ulaşma olasılığı tartışılmalıdır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Çözücü/Taşıyıcı
- taşıyıcı seçimi için gerekçe;
- eğer biliniyorsa, test maddesinin çözücü/taşıyıcı içindeki çözünürlüğü ve kararlılığı;

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, diyet. vs.;
- testin başında her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı, her bir grup için vücut ağırlığı aralığı, ortalama ve standart sapma dahildir;

Test koşulları:
- pozitif ve negatif (taşıyıcı/çözücü) kontrolleri;
- eğer yapıldıysa, aralık-bulma çalışmaları verileri;
- doz seçimi için gerekçe;
- test maddesi hazırlanmasıyla ilgili detaylar;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- uygulama yolu için gerekçe;
- eğer uygulanabiliyorsa, genel dolaşıma veya hedef dokuya ulaşan maddelerin doğruluğunu kanıtlamak için kullanılan yöntemler;
- eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi konsantrasyonun (ppm) mevcut doza (mg/kg vücut ağırlığı/gün) çevrilmesi;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar;
- muamele ve örnek alma planıyla ilgili detaylı tanım;
- lam hazırlama yöntemleri;
- toksisite ölçümü yöntemleri;
- mikroçekirdekli olgunlaşmamış eritrosit sayma ölçütleri;
- hayvan başına analiz edilen hücre sayısı;
- çalışmaları pozitif, negatif ve belirsiz olarak ayırma ölçütleri.

Sonuçlar:
- toksisite belirtileri;
- olgunlaşmamış eritrositlerin toplam eritrosit sayısına oranı;
- her bir hayvan için ayrı ayrı verilen mikroçekirdekli olgunlaşmamış eritrosit sayısı;
- grup başına düşen mikroçekirdekli olgunlaşmamış eritrosit ortalama □□standart sapması;
- uygun yerlerde, doz cevap ilişkisi;

- istatistiksel analizler ve uygulanan yöntemler;
- eş zamanlı ve geçmişe yönelik negatif kontrol verileri,
- eş zamanlı pozitif kontrol verileri.

Sonuçların tartışılması.

Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

(1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, 187-190.

(2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, 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: 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, 29-80.

(5) MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Eritrosit: 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, 555-558.

(6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erytrocytes. Mutation Res. 189: 103-112.

(7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The in vivo erythrocyte micronucleustest: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol. 14: 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, 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Eritrosit by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., 278, 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Memeli Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 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 Erythrocytes Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 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, 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, 241-247.

(15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Eritrosit Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocytes ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 347, 97-99.

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures.UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. CambridgeUniversity 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. 13/14. MUTAJENİTE: BAKTERİ KULLANARAK TERS MUTASYON TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem, OECD TG 471, Bakteriyel Ters Mutasyon Testi'ne (1997) eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bakteriyel ters mutasyon testinde, bir ya da bir miktar DNA baz çiftinin yer değiştirmesi, eklenmesi ve silinmesi (delesyonu) gibi nokta mutasyonlarını tespit etmek için Salmonella typhimurium ve Escherichia coli'nin aminoasite ihtiyaç duyan suşları kullanılır. (1)(2)(3). Bakteriyel ters mutasyon testinin ilkesi, test suşlarındaki mutasyonları tersine çeviren mutasyonları tespit etmek ve bakterinin vücutta sentezlenemeyen amino asit sentezleme kabiliyetini geri kazandırmaktır. Başlangıçtaki hallerine dönen bakteriler, ebeveyn test suşları için gerekli olan amino asitin yokluğunda yetişebilme kabiliyetleriyle tespit edilirler.

Nokta mutasyonları, insanda pek çok genetik hastalığın nedenidir ve onkogenlerdeki (hücrelerin kanser hücresine dönüşmesine neden olan gen) ve somatik (bedensel) hücrelerin tümör baskılayıcı genlerindeki nokta mutasyonların, insanda ve deney hayvanlarındaki tümör oluşumlarında yer aldığına dair önemli kanıtlar vardır. Bakteriyel ters mutasyon testi hızlı, ucuz ve uygulama açısından kolaydır. Testte kullanılan suşların çoğunun çeşitli özellikleri vardır. Bu özellikler onları, başlangıç hallerine dönme yerlerindeki duyarlı DNA dizileri, büyük moleküllere karşı hücre geçirgenliğinin artması ve DNA onarım sistemlerinin uzaklaştırılması veya hataya eğilimli DNA onarım sisteminin geliştirilmesi dâhil, mutasyonları belirlemeleri için daha duyarlı kılar. Testte kullanılan suşların özgünlükleri, genotoksik maddelerle uyarılan mutasyon türleri hakkında faydalı bilgi sağlayabilir. Bakteriyal ters mutasyon testlerinde çok geniş bir çeşitlilikteki yapılar için sonuçlarına ait büyük bir veri tabanı mevcuttur ve uçucu bileşikler de dâhil farklı fizikokimyasal özelliklere sahip kimyasalları test etmek için iyice oturtulmuş yöntembilimler geliştirilmiştir.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Ters mutasyon testi: Salmonella typhimurium ya da Escherichia coli'deki ters mutasyon testi aminoasidin dışardan alınmasına bağımlı olmayan suşlar üretmek için amino asite ihtiyaç duyan suşlarda (sırasıyla, histidin veya tritopan) mutasyonu belirler.

Baz çifti yer değiştirme mutajenleri, DNA'da baz değişikliklerine neden olan ajanlardır. Eski haline dönme (reversiyon) testinde bu değişiklik orijinal mutasyonun olduğu yerde veya bakteriyel genomdaki ikinci bir yerde meydana gelebilir.

Çerçeve kayması tipi (frameshift) mutajenleri: DNA'daki bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesine ya da kopmasına neden olarak RNA'da okunan yapıyı değiştiren ajanlardır.

1.3. Başlangıç varsayımları

Bakteriyel ters mutasyon testinde prokaryotik hücreler kullanılır ki bu alım, metabolizma, kromozom yapısı ve DNA onarım mekanizması gibi etkenlerle memeli hücrelerinden farklılık

gösterir. Yapay ortamda (in vitro) yürütülen testlerde genellikle dış kaynaklı metabolik aktivasyon kullanımı gereklidir. Yapay ortamda (In vitro) metabolik aktivasyon sistemleri canlı organizmada (in vivo) memeli koşullarına tamamen benzemez. Bu yüzden test, maddenin memelilerdeki mutajenik ve kanserojenik potansiyeli hakkında doğrudan bilgi sağlamaz.

Bakteriyel ters mutasyon testi yaygın olarak genotoksik (genetik olarak toksik) aktivitenin başlangıç taramalarında ve özellikle de nokta mutasyonları tetikleyen aktivitelerde uygulanır. Kapsamlı veri tabanı göstermiştir ki bu testte pozitif olan pek çok kimyasal ayrıca diğer testlerde de mutajenik aktivite gösterir. Bu testle tespit edilemeyen mutajenik ajanlarda vardır; bu eksiklik için sebepler metabolik aktivitedeki farklılıklar veya biyoyararlanım farklılıkları ve tayin edilen son noktanın özel doğasına atfedilebilir. Diğer taraftan bakteriyel ters mutasyon testinin duyarlılığını geliştiren etmenler mutajenik aktivite ön görülmesinde öncülük edebilirler.

Bakteriyel ters mutasyon testi, belli sınıftaki kimyasalların örneğin oldukça bakterisidal bileşiklerin (ör. Belli antibiyotikler) ve memeli hücresi replikasyon sistemiyle belirli olarak etkileştiği düşünülen veya bilinen maddelerin (ör. Bazı topoizomeraz inhibitörleri ve nükleozid eşleri) değerlendirilmesi için uygun olmayabilir. Böyle durumlarda memeli mutasyon testleri daha uygun olabilir.

Her ne kadar bu testte pozitif sonuç veren pek çok bileşik memelilerde kanserojense de ilişki kesin değildir. Bu, kimyasal sınıfa bağlıdır ve genotoksik olmayan veya bakteri hücrelerinde bulunmayan mekanizma(lar) gösterdikleri için bu test yöntemiyle tespit edilemeyen kanserojenler bulunmaktadır.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Bakteriyal hücrelerin süspansiyonları dış metabolik aktivite sisteminin varlığında ve yokluğunda test maddesine maruz kalırlar. Plaka birleşmesi yönteminde bu süspansiyonlar, kaplayıcı agarla karıştırılır ve minimal ortama plakalanır. Ön inkübasyon yönteminde, muamele gören (jelatimsi bir madde) karışım inkübe edilir ve daha sonra minimal bir ortama plakalanmadan önce kaplayıcı bir agarla karıştırılır. Her iki teknik için de, inkübasyondan iki veya üç gün sonra, başlangıçtaki hallerine dönen koloniler sayılır ve çözücü kontrol plakalarındaki kendi kendine başlangıçtaki hallerine dönen koloni sayısıyla karşılaştırılır.

Bakteriyal ters mutasyon testini uygulamak için çeşitli prosedürler tanımlanmıştır. Bunların arasında en yaygın olarak kullanılanlar tabaka birleşme yöntemi (1)(2)(3)(4), ön inkübasyon yöntemi (2)(3)(5)(6)(7)(8), dalgalanma yöntemi (9)(10) ve süspansiyon yöntemidir (11). Gazların ve buharların test edilmesi için değişiklikler tanımlanmıştır (12).

Yöntemde tanımlanan işlemler öncelikle tabaka birleşme ve ön inkübasyon yöntemlerine uygundur. Metabolik aktivasyonla veya metabolik aktivasyonsuz yürütülen deneylerde, ikisi de kabul edilebilirdir. Bazı maddeler ön inkübasyon yöntemi kullanılarak, daha verimli şekilde belirlenebilirler. Bu maddeler, kısa zincirli alifatik nitrozaminler, iki değerlikli metaller, aldehitler, azo-boyaları ve diazo bileşikleri, pirolizidin alkoloidleri, allil bileşikleri ve nitro bileşiklerini içeren kimyasal sınıflara aittir (3).Ayrıca belli sınıflardaki mutajenlerin plaka birleşme yöntemi ve ön inkübasyon yöntemi gibi standart yöntemler kullanılarak her zaman tespit edilmediği bilinmektedir. Bunlar 'özel durumlar' olarak ele alınmalıdır ve böyle maddelerin tespit edilmesi için değişik yöntemlerin kullanılması şiddetle tavsiye edilmektedir.

Bu 'özel durumlar' maddelerin tespit edilmesinde kullanılabilecek işlemlerin örnekleriyle birlikte şu şekilde tanımlanabilir: azo-boyaları ve diazo bileşikleri (3)(5)(6)(13), gazlar ve uçucu bileşikler (12)(14)(15)(16) ve glikozitler (17)(18). Standart yöntemden sapma olursa bilimsel olarak gerekçelendirilmelidir.

1.5. Test yönteminin tanımlanması

1.5.1. Hazırlıklar

1.5.1.1. Bakteri

Taze bakteri kültürleri sürekli artışın son evresine veya durağan evrenin başına kadar çoğaltılmalıdırlar (ml başına yaklaşık 10^9 hücre). Durağan evrenin sonundaki kültürler kullanılmamalıdır. Deneyde kullanılan kültürlerin yüksek içerikte (titre) canlı bakteri içermesi esastır. Yüksek sayıda, gerek geçmişe dayalı büyüme eğrisi verileriyle gerek her bir yöntemde plakalama yöntemiyle tespit edilen yaşayabilir hücre sayısı tespit edilerek gösterilebilir.

Tavsiye edilen inkübasyon sıcaklığı 37°C'dir.

En az beş bakteri ırkı kullanılmalıdır. Bunlar S. Typhimurium'un, laboratuvarlar arasında güvenilir ve tekrar üretilebilir cevaplarının olduğu gösterilen dört ırkını kapsar (TA 1535; TA 1537 veya TA97a or TA97; TA98 ve TA100). Bu dört S. typhimurium ırkının, birincil başlangıç hallerine dönme yerinde GS(Guanin-Sitozin) baz çifti vardır ve belli yükseltgen mutajenleri, çapraz-bağlayıcı ajanları ve hidrazinleri tespit edemediği bilinmektedir. Böyle maddeler, birincil başlangıç hallerine dönme yerinde AT baz çifti bulunan E. coli WP2 veya S. typhimurium TA102 (19) suşlarıyla tespit edilebilir. Bu sebeple tavsiye edilen suşların kombinasyonları aşağıdaki gibidir:

— S. typhimurium TA1535, ve

— S. typhimurium TA1537 veya TA97 veya TA97a, ve

— S. typhimurium TA98, ve

— S. typhimurium TA100, ve

— E. coli WP2 uvrA, veya E. coli WP2 uvrA (pKM101), veya S. typhimurium TA102.

Çapraz bağlı mutajenleri tespit etmek için, E. coli'nin TA102 ırkının dahil edilmesi veya DNA onarma yetkinliği olan suşlarının eklenmesi [ör. E. coli WP2 veya E. coli WP2 (pKM101)] tercih edilebilir.

Stok kültür karışımı, işaretleyici doğrulama ve saklama için yerleşik işlemler kullanılmalıdır. Büyüme için amino asit gereksinimi her bir donmuş kültür karışımı (S. typhimurium suşları için histidin ve E. coli suşları için triptofan) için belirtilmelidir. Diğer fenotipik karakteristikler benzer olarak kontrol edilmelidir, şöyle ki: Uygun yerlerde R-faktör plasmidlerinin [ör. ampisilline dirençli suşlar TA98, TA100 ve TA97a veya TA97, WP2 uvrA ve WP2 uvrA (pKM101) ve TA102 ırkında ampisillin + tetrasiklin direnci] varlığı ya da yokluğu; karakteristik mutasyonların varlığı (ör. kristal menekşeye hassasiyet nedeniyle S.typhimurium'da rfa mutasyonu ve E. Coli'de uvrA mutasyonu veya morötesi ışığa duyarlılık nedeniyle S.typhimurium'da uvrB mutasyonu) (2)(3). Suşlar ayrıca laboratuvardan

elde edilmiş geçmişe dayalı verilerlerden beklenen frekans aralığındaki veya tercihen literatürde rapor edilen aralıktaki kendi kendine olan başlangıçtaki hallerine dönen koloni plaka sayımlarını sağlamalıdır.

1.5.1.2. Ortam

Az miktarda uygun bir agar (Vogel-Bonner minimal ortam E and glukoz içeren) ve hücrenin ölmesini sağlayan, histidin ve biyotin veya triptofan içeren bir kaplayıcı agar kullanılır (1)(2)(9).

1.5.1.3. Metabolik aktivasyon

Bakteri test maddesine metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda maruz kalmalıdırlar. En yaygın kullanılan sistem, Aroclor 1254 (1)(2) veya fenobarbitonla ß–naftoflavon karışımı (18)(20)(21) enzim uyarıcı maddelerle muamele edilen kemirgenlerin karaciğerlerinden elde edilen kofaktör-destekli post-mitokondriyal kısmıdır (S9). Post-mitokondriyal kısım, S9 karışımında genellikle nihai test ortamının %5–30 v/v, konsantrasyon aralığında kullanılır. Metabolik aktivasyon sisteminin koşulları test edilen kimyasalın sınıfına bağlı olabilir. Bazı durumlarda post-mitokondriyal kısmın birden fazla konsantrasyonunun kullanılması uygun olabilir. Azo-boyaları ve diazo-bileşikleri için, indirgen bir metabolik aktivasyon sisteminin kullanılması daha uygun olabilir (6)(13).

1.5.1.4. Test maddesi/Hazırlık

Bakteri muamele edilmeden önce uygunsa, katı test maddeleri uygun çözüler veya taşıyıcılar içinde çözünmeli veya askıda kalmalı ve seyreltilmelidir. Sıvı test maddeleri muamele edilmeden önce test sistemine doğrudan eklenebilirler veya seyreltilebilirler. Kararlılığıyla ilgili veriler test maddesinin saklanmasının uygun olduğunu göstermedikçe taze hazırlanmış olanları uygulanmalıdır.

Çözücü/taşıyıcı, test maddesiyle kimyasal reaksiyona girmemeli ve bakterilerin hayatta kalmalarıyla ve S9 aktivitesiyle uyumlu olmalıdır (22). Eğer çok iyi bilinen çözücüler/taşıyıcılar dışındakiler kullanılırsa, içerikleri uyumlu olduklarını gösteren verilerle desteklenmelidir. Mümkün olan yerlerde, sulu çözelti/taşıyıcı kullanımının ilk önce göz önünde bulundurulması tavsiye edilir. Suda kararsız olan maddeler test edilirken, kullanılan organik çözeltilerde su olmamalıdır.

1.5.2. Test koşulları

1.5.2.1. Test suşları (Bakınız 1.5.1.1)

1.5.2.2. Maruz kalma konsantrasyonu

Kullanılacak test maddesinin en yüksek miktarını belirlerken dikkate alınması gereken konsantrasyon faktörleri arasında sitotoksisite ve son muamele karışımının çözünürlüğü vardır.

Toksisite ve çözünmezliğin bir ön deneyle belirlenmesi faydalı olabilir. Sitotoksisite (hücreler için toksik olan madde) başlangıçtaki hallerine dönen koloni sayısındaki düşüş , temel düzeyde temizleme veya azalma veya muamele edilen kültürlerin hayatta kalma yüzdesi ile

belirlenebilir. Bir maddenin sitotoksisitesi metabolik aktivasyon sistemlerinin varlığında değişebilir. Maddenin çözünmezliği mevcut test koşulları altında ve çıplak gözle görünür şekilde, son karışımdaki çökelti olarak değerlendirilmelidir.

Çözünebilen sitotoksik olmayan maddeler için tavsiye edilen maksimum test konsantrasyonu 5 mg/ veya 5 µl/plaka'dır. 5 mg/ plaka veya 5 µl/plaka'da çözünemeyen sitotoksik olmayan maddeler için, test edilen bir veya daha fazla konsantrasyon son muamele karışımında çözünebilir olmamalıdır. 5 µl/plaka veya 5 mg/ plaka değerlerinin altında zaten sitotoksik olan test maddeleri sitotoksik konsantrasyona kadar test edilmelidir. Çökelti, skorlamaya mani olmamalıdır.

Test maddesine ait en az beş farklı analiz edilebilir konsantrasyon, bir başlangıç deneyi için test noktaları arasında yaklaşık yarım log (ör. $\sqrt{10}$) aralıklarla kullanılmalıdır. Konsantrasyon-etki ilişkisi araştırılırken daha küçük aralıklar kullanılması daha uygun olabilir. Önemli miktarda mutajenik safsızlık içeren maddeler değerlendirilirken, 5 mg/plaka veya 5 µl/plaka üzerindeki konsantrasyonlarda test uygulamasının yapılması üzerinde durulabilir.

1.5.2.3. Negatif ve pozitif kontroller

Eş zamanlı, ırka-özgü, pozitif ve negatif (çözücü veya taşıyıcı) kontroller, metabolik aktivasyonun hem varlığında hem de yokluğunda her bir deneyde de yer almalıdır. Her bir yöntemin etkili şekilde yürütülmesini sağlayan pozitif kontrol konsantrasyonları seçilmelidir. Metabolik aktivasyon sisteminin uygulandığı yöntemler için pozitif konrol referans maddesi/maddeleri kullanılan bakteri suşlarının türüne dayanarak seçilmelidir.

Aşağıdaki maddeler metabolik aktivasyonla yürütülen yöntem için uygun olan pozitif kontrol maddelerine örneklerdir:

CAS Numarası	EINECS Numarası	İsimler
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantrasen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenz[a]antrasen
50-32-8	200-028-5	Benzo[a]piren
613-13-8	210-330-9	2-aminoantrasen
50-18-0		siklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	siklofosfamidmonohidrat

Aşağıdaki madde indirgeyici metabolik aktivasyon metodu için uygun olan pozitif kontroldur.

CAS Numarası	EINECS Numarası	İsimler
573-58-0	209-358-4	Kongo kırmızısı

2–Aminoantrasen, S9 karışımı etkisinin tek başına belirteci olarak kullanılmamalıdır. 2-aminoantrasen kullanılırsa, her bir S9 serisi ayrıca mikrozomal enzimlerle sağlanan metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan bir mutajenle (örn. benzo[a]piren, dimethilbenzantrasen) karakterize edilmelidir.

Aşağıdaki maddeler, dış metabolik aktivasyon sistemi olmadan yürütülen analizler için kullanabilecek ırka özgü pozitif kontrollere örnektir:

CAS numarası	EINECS numarası	İsim	Suş
26628-22-8	247-852-1	sodyum azid	TA 1535 ve TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofloren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridin	TA 1537, TA 97 ve TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 ve TA 97a
80-15-9	201-254-7	kümen hidroperoksit	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomisin C	WP2 uvrA ve TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidin	WP2, WP2uvrA ve WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrokinolin-1-oksit	WP2, WP2uvrA ve WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furilfuramid (AF2)	Plazmid içeren suşlar

Diğer uygun pozitif kontrol referans maddeleri kullanılabilir. Mevcut olduğu durumlarda, kimyasal sınıfla ilişkili pozitif kontrol kimyasallarının kullanımı düşünülmelidir.

Test maddesi olmadan, sadece çözücü veya taşıyıcı içeren farklı işlem gruplarıyla aynı şekilde muamele edilecek olan negatif kontroller yer almalıdır.Ek olarak, geçmişe yönelik kontrol verileri seçilen çözücüyle sağlığa zararlı veya mutajenik etkilerin uyarıldığını göstermediği sürece muamele edilmemiş kontroller de kullanılmalıdır.

1.5.3. İşlem

Tabaka birleşme yöntemi için (1)(2)(3)(4), metabolik aktivasyonsuz genellikle 0.05 ml veya 0.1 ml test çözeltileri, 0.1 ml taze bakteri kültürü ((yaklaşık 10^8 yaşayabilir hücre içerir) ve 0.5 ml steril tampon 2.0 ml kaplayıcı agarla karıştırılır. Metabolik aktivasyonlu yöntem için, genellikle uygun miktarda post-mitokondriyel fraksiyon içeren (metabolik aktivasyon karışımında %5-30 v/v aralığında) 0.5 ml'lik metabolik aktivasyon karışımı kaplayıcı agarla(2.0 ml), bakteri ve test maddesi/test çözeltisiyle karıştırılır. Her bir tüpün içeriği karıştırılır ve minimal agar plakasının üzerine dökülür. Kaplayıcı agarın inkübasyondan önce katılaşması sağlanır.

Ön inkübasyon yöntemi için (2)(3)(5)(6), test maddesi/test çözeltisi test ırkıyla (yaklaşık 10^8 yaşayabilir hücre içerir) ve steril tampon veya metabolik aktivasyon sistemiyle (0.5 ml) kaplayıcı agarla karıştırılmadan ve minimal agar, plakaya dökülmeden önce genelde 20 veya daha fazla dakika 30-37°C'de ön inkübasyona tabi tutulur. Genellikle, 0.05 veya 0.1 ml test maddesi/test çözeltisi, 0.1 ml bakteri ve 0.5 ml S9-karışım veya steril tampon, 2.0 ml kaplayıcı agarla karıştırılır. Atüpler preinkübasyon sırasında çalkalayıcı kullanılarak havalandırılmalıdır.

Uygun bir değişim tahmini için her dozda üçlü plakalama kullanılmalıdır. Bilimsel gerekçe mevcutsa ikili plaka da kabul edilebilir. Arasıra meydana gelen plaka kaybı yöntemi geçersiz kılmaz.

Gazlar veya uçucu maddeler, kapaklı kaplardaki uygun yöntemlerle test edilmelidir (12)(14)(15)(16).

1.5.4. İnkübasyon

Yöntemde kullanılacak tüm plakalar 37°C'de 48-72 saat inkübe edilmelidir. İnkübasyon süresi sonunda plaka başına başlangıçtaki hallerine dönen koloni sayılır.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Veriler, plaka başına başlangıçtaki hallerine dönen koloni sayısı olarak sunulmalıdır. Hem negatif (kullanıldıysa çözücü kontrol ve muamele edilmemiş kontrol) hem de pozitif kontrol plakalarındaki başlangıçtaki hallerine dönen koloni sayısı da ayrıca verilmelidir. Ayrı ayrı plaka sayımları, plaka başına ortalama başlangıçtaki hallerine dönen koloni sayısı ve standart sapma, test maddesi ve pozitif ve negatif (muamele edilmemiş ve/veya çözücü) kontroller için sunulmalıdır.

Net bir pozitif cevabın doğrulanmasına gerek yoktur. Şüpheli sonuçların, tercihen deneysel koşulların yeniden düzenlenmesi yoluyla, ilave testlerle netleştirilmesi gereklidir. Negatif sonuçların ayrı ayrı doğrulanması gerekir. Negatif sonuçların doğrulanmasının yeterli olmadığının düşünüldüğü durumlarda gerekçe sağlanmalıdır. Koşulların aralığını genişletmek için çalışma parametrelerinin değişikliğine dair değerlendirilmeler takip edilen deneylerde göz önünde bulundurulmalıdır. Değişiklik yapılabilecek çalışma parametrelerine konsantrasyon aralıklandırılması, muamele yöntemleri (plaka katılımı veya sıvı ön inkübasyonu) ve metabolik aktivasyon koşulları dahil edilebilir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Pozitif sonuç tayin etmek için, test edilen aralığın üzerinde konsantrasyona bağlı artış ve/veya bir ırkta veya metabolik aktivasyon sistemi olmadan plaka başına düşen başlangıçtaki hallerine dönen koloni sayısındaki bir veya daha fazla konsantrasyondaki tekrarlanabilir artış gibi bazı kriterler vardır (23) Sonuçlar ilk önce biyolojik açıdan değerlendirilmelidir. İstatistiksel yöntemler, test sonuçlarını değerlendirirken yardımcı olarak kullanılabilir (24). Ancak istatistiksel belirlilik pozitif bir cevap için tek belirleyici etken olmamalıdır.

Yukarıdaki kriterlere uymayan bir test maddesinin, bu testte mutajenik olmadığı düşünülür.

Her ne kadar pek çok deney pozitif ve negatif sonuçları açıkça verecekse de, nadir durumlarda veri kümeleri test maddesinin aktivitesi hakkında net bir karara varılmasına engel olacaktır. Sonuçlar, uygulanan deneylerin sayısından bağımsız olarak belirsiz veya şüpheli olabilir.

Bakteriyel ters mutasyon testinden elde edilen pozitif sonuçlar, maddenin, baz yer değiştirmeleri veya yapı kaymalarıyla Salmonella typhimurium ve/veya Escherichia coli genomundaki nokta mutasyonlara neden olduğunu gösterir.

Test koşullarındaki negatif sonuçlar, test maddesinin test edilen türde mutajenik olmadığını gösterir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Çözücü/Taşıyıcı
- çözücü/taşıyıcı seçimi için gerekçe;
- biliniyorsa, test maddesinin çözücü/taşıyıcı içindeki çözünürlüğü ve kararlılığı;

Suşlar:
- kullanılan suşlar
- kültür başına düşen hücre sayısı
- suşların karakteristikleri

Test koşulları :
- doz seçiminin gerekçesi ve konsantrasyon başına düşen plaka sayısıyla birlikte plaka başına düşen test maddesi (mg/plaka veya µl/plaka)
- kullanılan ortam
- kabul edilebilirlik kriteri dahil, metabolik aktivasyon sisteminin türü ve kompozisyonu;
- muamele prosedürleri

Sonuçlar:
- toksisite belirtileri,
- çökelti belirtileri;
- ayrı ayrı plaka sayımları
- plaka başına düşen başlangıç hallerine dönen kolonilerin ortalama sayısı ve standart sapma;
- mümkün yerlerde, doz-cevap ilişkisi;
- varsa, istatistiksel analizler
- eş zamanlı negatif (çözücü/taşıyıcı) ve pozitif kontrol verileri, aralıkları, ortalamaları ve standart sapmalarıyla birlikte;
- geçmişe yönelik negatif (çözücü/taşıyıcı) ve pozitif kontrol verileri, aralıkları, ortalamaları ve standart sapmalarıyla birlikte;

Sonuçların tartışılması.
Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

(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, 347-364.

(2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 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, 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, 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, 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, 167-177.

(9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bakteri. 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.

(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, 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, 335-344.

(13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, 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, 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). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, 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 Salmonellatyphimurium. Cancer Res., 39, 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, 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, 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., 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.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88 343-350.

(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 Bakteriyal Mutagenicity. Mutation Res. 189, 83- 91.

(24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B.15 MUTAJENİTE TESTİ VE KANSEROJENİTENİN İZLENMESİ GEN MUTASYONU-*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok

1.4. Test yönteminin ilkesi

Metabolik aktivasyona sahip veya sahip olmayan kimyasal ajanlarla uyarılan genlerde oluşan mutasyonları ölçmek için Saccharomyces cerevisiae mayasının çeşitli tek kromozom setine sahip (haploid) ve yarısı anneden yarısı babadan gelmek üzere, türe has kromozom sayısı gösteren (diploid) hücre suşları kullanılabilir.

Kırmızı ve adenine ihtiyaç duyan mutantların (ade-1, ade-2) çifte adenine ihtiyaç duyan beyaz mutantlara mutasyonunun ölçülmesi ve canavnaine ve siklohekzamide dayanıklılık gelişmesi gibi haploid suşlardaki ileri mutasyon sistemleri kullanılmaktadır.

Geçerli en yaygın ters mutasyon sistemi bölgeye özgü mutasyonları veya aşı boyası baskılayıcı mutasyonları uyaran temel yer değiştirme (ikame) mutasyonları ile tersinir olan ade2-1, arg 4-17, lys 1-1 vw trp 5-48 anlamsız aşı boyası (ochre) mutasyonlarını taşıyan XV 185-14C haploid ırkının kullanımını içerir. XV 185-14C ayrıca ikinci bölge mutasyonlarıyla ilk haline dönüşen bir yanlış anlamlı mutasyon his 1-7 işaretleyicisini ve çerçeve kayması tipi mutajenleriyle ilk haline dönüşen işaretleyici hom 3-10'u da taşır.

S. cerevisia'nın diploid suşlarında kullanılan geçerli tek ırk ilv 1-92 için homozigot olan D7'dir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Test kimyasalları ve kontrol çözeltileri, uygun bir taşıyıcı kullanılarak, teste başlamadan hemen önce hazırlanmalıdır. Etanol, aseton veya dimetilsülfoksit (DMSO) gibi organik çözücülerin %2'yi (v/v) geçmeyen çözeltileri gibi suda çözünmeyen organik bileşiklerle

kullanılmalıdır. Taşıyıcının son konsantrasyonu hücrenin yaşama kabiliyetini ve büyüme özelliklerini belirgin olarak etkilememelidir.

Metabolik Aktivasyon

Hücreler, uygun dış kaynaklı metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda test kimyasallarına maruz bırakılmalıdır.
En yaygın kullanılan sistem, enzim indirgeyici maddelerle ön muamelesi yapılan, kemirgenlerin karaciğerlerinden gelen kofaktör destekli post-mitokondriyel kısımdır. Metabolik aktivasyon için diğer türlerin, dokuların, post-mitokondriyel kısımların veya başka işlemlerin kullanımı da uygun olabilir.

Test koşulları

Test edileceksuşlar

XV 185-14C haploid ırkı ve D7 diploid ırkı, gen mutasyon çalışmalarında çoğunlukla kullanılır. Ayrıca diğer suşların kullanımı da uygun olabilir.

Ortam

Yaşam sürekliliğinin sağlanması ve mutant sayılarının belirlenmesi için uygun kültür ortamı kullanılır.

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanımı

Pozitif, muamele edilmiş ve çözücü kontrolleri aynı anda uygulanmalıdır. Her bir özel mutasyona ait son nokta için uygun pozitif kontrol kimyasalları kullanılmalıdır.

Maruz kalma konsantrasyonu

En az beş uygun aralıklı test maddesi konsantrasyonu kullanılmalıdır. Toksik maddeler için, test edilen en yüksek konsantrasyon değeri hayatta kalanların sayısını %5-10'un altına düşürmemelidir. Nispeten suda çözünmeyen maddeler uygun işlemler kullanılarak çözünürlük sınırlarına kadar test edilmelidirler. Serbestçe suda çözünen, toksik olmayan maddeler için durum bazında üst konsantrasyon belirlenmelidir.

İnkübasyon koşulları

Plakalar karanlıkta dört-yedi gün arasında 28- 30 °C derece sıcaklıkta inkübe edilirler.

Kendiliğinden olan mutasyon sıklıkları

Alt kültürler, kabul edilen normal aralığın içinde kendi kendine olan mutasyon sıklıklarıyla kullanılmalıdır.

Tekrarların sayısı

Gen mutasyonuyla meydana gelen prototrop (tek kaynaktan besin alma) analizi ve hücrelerin yaşayabilmesi için konsantrasyon başına en az üç tekrar plakası kullanılmalıdır. Düşük

mutasyon hızı olan hom 3-10 gibi işaretleyicilerin kullanıldığı durumlarda, istatistiksel olarak anlamlı veriler elde etmek için plaka sayıları artırılmalıdır.

İşlem

S. cerevisia suşlarının muamele edilmesi genellikle hem durağan faz hem de büyüme hücrelerini içeren sıvı test işlemlerinde ile gerçekleştirilir. Başlangıç deneyleri büyüme hücrelerinde yürütülmelidir. 1-5 x 10^7 hücre/ml, 18 saate kadar 28 -37 °C'de çalkalanarak, test kimyasalına maruz kalır. Metabolik aktivasyon sisteminin uygun bir miktarı gerektiğinde işlem sırasında ilave edilir. İşlem sonunda sonunda, hücreler santrifüjlenir, yıkanır ve uygun kültür ortamına ekilir. İnkübasyondan sonra, plakalar hayatta kalma ve gen mutasyonlarına neden olma durumlarına göre işaretlenir.
Eğer ilk deney negatifse, durağan faz hücreleri kullanılarak ikinci bir deney yürütülmelidir. Eğer ilk deney pozitifse, uygun bağımsız bir deneyle doğrulanmalıdır.

2. VERİLER

Veriler, sayılan koloni sayısını, mutant sayısını, hayatta kalan sayısını ve mutant frekansını gösteren içeren bir tablo halinde sunulmalıdır. Bütün sonuçlar bağımsız bir deneyle doğrulanmalıdır.
Veriler uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmelidir.

3. RAPOR

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

-kullanılan ırk
-test koşulları, durağan faz veya büyüme hücreleri, ortamın bileşenleri, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, metabolik aktivasyon sistemi,
-muamele koşulları: maruz kalma seviyeleri, işlem ve uygulamanın uzunluğu, uygulama sıcaklığı, pozitif ve negatif kontroller,
-sayılan kolonilerin sayısı, mutantların sayısı, hayatta kalanların sayısı ve mutant frekansı, uygulanabiliyorsa, doz/cevap ilişkisi, verilerin istatistiksel değerlendirilmesi,
-sonuçların tartışılması,
-sonuçların yorumlanması

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Genel Giriş Kısım (E).

B.16 MİTOTİK REKOMBİNASYON -*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok

1.4. Test yönteminin ilkesi

Saccharomyces cerevisiae'deki mitotik rekombinasyon, genler arasında (veya daha genel olarak bir gen ve onun sentromeri arasında) ve gen içinde tespit edilebilir. İlk olay mitotik çaprazlama olarak adlandırılır ve iki taraflı-karşılıklı ürün meydana getirir, ikincisi ise sıklıkla iki taraflı değildir ve gen dönüşümü olarak adlandırılır. Çaprazlama genellikle heterozigot bir ırkta çekinik homozigot kolonilerin veya kesmelerin oluşumuyla, farklı olarak gen dönüşümü, aynı genin iki farklı kusurlu allelini taşıyan oksotrofik heteroalelik ırkta meydana gelen tek bir kaynaktan beslenme ile geri mutasyon sonucu canlının ilkel halinedönüşümüyle denenir. Mitotik gen dönüşüm tayini için en sık kullanılan suşlar D_4 (ade 2 ve trp 5'te heteroallelik), D_7 (trp 5'te heteroallelik), BZ_{34} (arg 4'te heteroallelik) ve JDl (his 4 ve trp 5'te heteroallelik)'dir. Kırmızı ve pembe homozigot kesimler oluşturan mitotik çaprazlama (crossing-over), D_5 veya ayrıca ilv 1-92'de mitotik gen dönüşümü ve ters mutasyonu da ölçen D_7'de denenebilir. Her iki ırk da ade 2'nin tamamlayıcı alelleri için heteroalleliktir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Test kimyasallarının, kontrol veya referans bileşikleri çözeltileri, uygun bir taşıyıcı kullanılarak, teste başlamadan hemen önce hazırlanmalıdır. Etanol, aseton veya dimetilsülfoksid (DMSO) gibi organik çözücülerin %2'yi (v/v) geçmeyen çözeltiler gibi suda çözünmeyen organik bileşikler kullanılmalıdır. Taşıyıcının son konsantrasyonu hücrenin yaşama kabiliyetini ve büyüme özelliklerini belirgin olarak etkilememelidir.

Metabolik Aktivasyon

Hücreler, uygun dış kaynaklı metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda test kimyasallarına maruz bırakılmalıdır. En yaygın kullanılan sistem enzim indirgeyici maddelerle ön-muamelesi yapılan, kemirgenlerin karaciğerlerinden gelen kofaktör

destekli post-mitokondriyel kısımdır. Metabolik aktivasyon için diğer türlerin, dokuların, post-mitokondriyel kısımların veya başka işlemlerin kullanımı da uygun olabilir.

Test koşulları

Test edilecek suşlar

Sıklıkla kullanılan diploid suşlar D_4, D_5, D_7 ve JD1'dir. Diğer suşların kullanımı uygun olabilir.

Ortam

Yaşam sürekliliğinin sağlanması ve mitotik rekombinasyon frekansı belirlenmesi için uygun kültür ortamları kullanılır.

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanımı

Pozitif, muamele edilmemiş ve çözücü kontrolleri aynı anda uygulanmalıdır. Her bir özel rekombinasyon son noktası için uygun pozitif kontrol kimyasalları kullanılmalıdır.

Maruz kalma konsantrasyonları

En az beş uygun aralıklı test maddesi konsantrasyonu kullanılmalıdır. Dikkate alınması gereken faktörler arasında hücre zehirlenmesi ve çözünürlük vardır. En düşük konsantrasyonun hücrenin yaşama kabiliyeti üzerinde hiçbir etkisi olmamalıdır. Toksik kimyasallar için, denenmiş en yüksek konsantrasyon değeri hayatta kalma oranını %5-10'un altına düşürmemelidir. Nispeten suda çözünmeyen maddeler uygun işlemler kullanılarak çözünürlük sınırlarına kadar test edilmelidirler. Serbestçe suda çözünen, toksik olmayan maddeler için durum bazında üst konsantrasyon belirlenmelidir.

Hücreler test kimyasallarına ya hareketsiz fazda ya da 18 saate kadar olan büyüme sürelerinde maruz kalırlar. Ancak, uzun süren muamelelerde kültürler spor oluşumları için mikroskobik olarak incelenmelidir, spor oluşumu testi geçersiz kılar.

İnkübasyon koşulları

Plakalar karanlıkta dört-sekiz gün arasında 28 -30 °C sıcaklıkta inkübe edilirler. Mitotik çaprazlamayla (crossing-over) oluşan kırmızı ve pembe homozigot kesme yöntemi için kullanılan plakalar (uygun boyanmış kolonilerin gelişmesine izin vermek için saymadan iki gün önce) bir buzdolabında (yaklaşık 4 °C' de) bir sonraki test için saklanmalıdır.

Kendiliğinden mitotik rekombinasyon frekansları

Alt-kültürler, kabul edilen normal aralığın içinde kendi kendine olan mutotik yeniden birleşme mutasyon frekanslarıyla, kullanılmalıdır.

Tekrarların sayısı

Mitotik gen dönüşümüyle meydana gelen prototrop (tek kaynaktan besin alma) ve hücrelerin yaşayabilmesi için konsantrasyon başına en az üç tekrar plakası kullanılmalıdır. Mitotik

çaprazlamayla çekinik homozigot oluşan yöntemde uygun koloni sayısı elde etmek için plaka sayıları artırılmalıdır.

İşlem

S. cerevisia suşlarının muamele edilmesi genellikle hem durağan faz hem de büyüme hücresini içeren sıvı test işlemlerinde gerçekleştirilir. Başlangıç deneyleri büyüme hücrelerinde gerçekleştirilmelidir. 1-5 $X10^7$ hücre/ml, 18 saate kadar 28 -37 °C'de çalkalanarak, test kimyasalına maruz kalır: Metabolik aktivasyon sisteminin uygun bir miktarı gerektiğinde işlem sırasında ilave edilir.
İşlem sonunda, hücreler santrifüjlenir, yıkanır ve uygun kültür ortamına ekilir. İnkübasyondan sonra, plakalar hayatta kalma ve mitotik rekombinasyonun uyarılması için işaretlenir.

Eğer ilk deney negatifse, durağan faz hücreleri kullanılarak ikinci bir deney yürütülmelidir. Eğer ilk deney pozitifse uygun, bağımsız bir deneyle doğrulanmalıdır.

2. VERİLER

Veriler sayılan koloni sayısını, rekombinant sayısını, rekombinantların hayatta kalma oranı ve frekansı gösterecek şekilde tablo haline getirilerek sunulmalıdır.
Sonuçlar bağımsız bir deneyle doğrulanmalıdır.

Veriler uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

-kullanılan ırk
-test koşulları, durağan faz veya büyüme hücreleri, ortamın bileşenleri, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, metabolik aktivasyon sistemi,
-muamele koşulları: maruz kalma konsantrasyonu, işlem ve muamele süresi, muamele sıcaklığı, pozitif ve negatif kontroller,
-sayılan koloni sayısı, rekombinant sayısı, hayatta kalma oranı ve rekombinasyon frekansı, uygulanabiliyorsa, doz/cevap ilişkisi, verilerin istatistiksel değerlendirilmesi,
-sonuçların tartışılması,
-sonuçların yorumlanması

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.17 MUTAJENİTE - IN VITRO MEMELİ HÜCRESİ GEN MUTASYONU TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 476 In Vitro Memeli Hücresi Gen Mutasyonu Testi (1997)'nin tekrarıdır.

1.1. Giriş

In VitroMemeli Hücresi Gen Mutasyonu Testi gen mutasyonlarını tayin etmek için kullanılabilir. Uygun hücre dizileri L5178Y fare lenfoma hücrelerini, CHO, CHO-AS52 'yi ve hamster hücrelerinin V79 dizilerini ve TK6 insan lenfoblastoid hücrelerini kapsar (1). Bu hücre dizileri arasında en yaygın kullanılanı, timidin kinaz (TK) ve hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT) ve ksantin-guanin fosforibozil transferaz (XPRT)'ın transgeninde genetik ölçüm mutasyonlarıdır. TK, HPRT ve XPRT mutasyon testleri genetik olayların farklı spektrumlarını belirlerler. TK ve XPRT'nin otozomal konumları X kromozomlarının HPRT lokuslarında (Bir genin kromozom üzerinde bulunduğu bölgeye verilen ad) tayin edilmeyen genetik olayların (örneğin büyük silinmeler (Bir tip kromozom mutasyonu sonucunda DNA' daki bir bazın ya da bazların yok olması hali)) tayinine olanak sağlayabilir (2)(3)(4)(5)(6).

In Vitro Memeli Hücresi Gen Mutasyonu Testinde, genel olarak kullanılan hücre dizilerinin kültürleri veya hücre suşları kullanılabilir. Kullanılan hücreler kültürdeki büyüme kabiliyetleri temeline ve kendiliğinden olan mutasyon frekansının kararlılığına göre seçilir.

In vitro içinde yürütülmüş testlerde genelde dış kaynaklı metabolik aktivasyonun kullanılması gerekir. Bu metabolik aktivasyon sistemi, memelilerdeki in vivo koşulları tamamen taklit edemez. Esas mutasyona sebep olma özelliğini yansıtmayan sonuçlara sebep olabilecek koşullardan kaçınılmasına dikkat edilmelidir. Esas mutasyona sebep olma özelliğini yansıtmayan pozitif sonuçlar, pH, ozmolalite değişiklikleri veya yüksek düzeyde sitotoksisiteden kaynaklanabilir (7).

Bu test, olası memeli mutajen ve kanserojenlerini taramak için kullanılır. Bu testte pozitif çıkan pek çok bileşik, memeliler için kanserojendir, ancak bu test ve kansere sebep olma özellik (kanserojenlik) arasında tam bir bağlantı yoktur. Bağlantı kimyasal sınıfa bağlıdır ve bu testle belirlenemeyen kanserojenler olduğuna dair giderek artan sayıda kanıt vardır, çünkü diğer sitotoksik olmayan mekanizmalar veya bakteri hücrelerinde olmayan mekanizmalar gibi davranırlar(6).

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

İleri mutasyon: Anne ya da babaya ait tip kodlanmış protein fonksiyonlarının enzimatik aktivite kaybına veya değişikliklerine neden olan mutant biçimine sokan gen mutasyonu.

Baz çifti yer değiştirme mutajenleri: DNA'daki bir veya daha fazla baz çiftinin yer değiştirmesine neden olan maddeler

Çerçeve kayması tipi (frameshift) mutajenleri: DNA molekülünde bir veya daha fazla baz çiftinin katılmasına veya eksilmesine neden olan maddeler

Fenotipik ekspresyon zamanı: değişmemiş gen ürünlerinin yeni mutasyona uğramış hücrelerde tükenme süresi

Mutant frekansı: gözlenen mutant hücrelerin sayısının canlı hücre sayısına bölümü

Bağıl toplam büyüme: hücrelerin kontrol popülasyonlarına kıyasla belli bir zamanın üzerinde hücre sayısındaki artıştır; negatif kontrole göre bağıl süspansiyon büyüme ürünüyle, negatif kontrole göre bağıl klonlama verimliliğinin çarpılmasıyla hesaplanır.

Bağıl büyüme: Negatif kontrole göre bağıl ekspresyon süresinin üzerinde hücre sayısındaki artış.

Canlılığı sürdürme yeteneği: Ekspresyon periyodu sonrasındaki seçici koşullarda kaplama zamanında muamele edilmiş hücrelerin klonlama verimi.

Sağkalım: muamele edilen hücrelerin, muamele süresi sonunda kaplanmış kolonlama verimliliği; genellikle kontrol hücre popülasyonun hayatta kalmasıyla ilişkili olarak ifade edilir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

$TK^{+/-}$ ->$TK^{-/-}$ mutasyonu nedeniyle timidin kinazları (TK) olmayan hücreler, primidin analoğu olan triflorotimidinin (TFT) sitotoksik etkilerine dirençlidirler. Timidin kinaza yetkin hücreler hücresel metabolizmanın inhibisyonuna neden olan ve bir sonraki hücre bölünmesini durduran TFT'ye duyarlıdır. Bu mutant hücreler TFT varlığında çoğalabilirken, timidin kinaz içeren normal hücreler çoğalamazlar. Benzer şekilde, HPRT veya XPRT içermeyen hücreler 6-tiyoguanin (TG) veya 8-azaguanine (AG) direnç göstermeleriyle seçilirler. Herhangi bir memeli hücresi gen mutasyon testlerinde, bir baz ya da seçiçi ajanla ilişkili bir bileşik test edilirse, test maddesinin özellikleri dikkatlice gözden geçirilmelidir. Örneğin, test maddesinin mutant veya mutant olmayan hücrelerdeki şüpheli herhangi bir seçici toksisitesi araştırılmalıdır. Bu, seçici ajanla yapısal olarak ilişkili kimyasallar test edilirken seçim sisteminin/ajanının perfonmansı teyit edilmelidir (8).

Süspansiyondaki veya tek tabakalı kültürdeki hücreler bir süre metabolik aktivasyonun hem varlığında hem de yokluğunda test maddesine maruz kalırlar ve sitotoksisitenin belirlenmesi ve mutant seçiminden önce fenotipik ifadenin ortaya çıkması için alt kültürlenirler (subcultured) (9)(10)(11)(12)(13). Sitotoksisite genellikle, muamele periyodundan sonra kültürlerin bağıl klonlama verimliliği (hayatta kalma) veya bağıl toplam büyümeleriyle belirlenir. Muamele edilen kültürler, mutasyonların en uyguna yakın fenotipik ifadelerinin ortaya çıkması için büyüme ortamında yeterli bir sürede, seçilen her lokus (Bir genin kromozom üzerinde bulunduğu bölgeye verilen ad) ve hücre tipi karakteristiğinde korunmalıdır. Mutant frekansı, mutant hücreleri tespit etmek için seçici ajan bulunan ortamda ve klonlama verimliliğini (canlılığı sürdürme yeteneği) tespit etmek için seçici ajanın olmadığı ortamda bilinen sayıda hücre ekilerek belirlenir. Uygun bir inkübasyon süresinden sonra koloniler sayılır. Mutant frekansı seçici ortamdaki mutant kolonilerin sayısıyla seçici olmayan ortamdaki kolonilerin sayısından elde edilir.

1.4. Test yönteminin tanımı

1.4.1. Hazırlıklar

1.4.1.1. Hücreler

Bu testte L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 veya TK6 hücrelerinin altklonlarını kapsayan çeşitli mevcut hücre tipleri kullanılabilir. Bu testte kullanılan hücre tipleri kimyasal mutajenlere karşı kanıtlanmış bir hassasiyete, yüksek bir klonlama verimine ve kararlı bir spontan mutant frekansına sahip olmalıdır. Hücreler mikoplazma kontaminasyonu için kontrol edilmeli ve kontaminasyon varsa kullanılmamalıdır. Test, duyarlılığının ve gücünün önceden belirlenebileceği şekilde tasarlanmalıdır. Hücrelerin sayısı, kültürler ve kullanılan test maddesinin konsantrasyonu tanımlanan bu parametreleri yansıtmalıdır(14). Bu testte her aşamada kullanılan ve en az sayıdaki hücre kullanımı uygulamasıyla sağ kalan hücreler mutant frekansına dayanmalıdır. Genel kural, spontan mutant frekansının tersinin en az on katı hücre sayısı kullanmaktır. Ancak en az 10^6 hücre kullanılması tavsiye edilmektedir. Testin tutarlı performansını göstermek için, kullanılan hücre sistemine ait yeterli tarihsel veriler mevcut olmalıdır.

1.4.1.2. Ortam ve kültür koşulları

Kültürlerin elde edilmesinde uygun kültür ortamı ve inkübasyon koşulları (kültür kapları, CO_2 konsantrasyonu, sıcaklık ve nem) kullanılmalıdır. Ortam, testte kullanılan seçici sistemlere ve hücre tipine bağlı olarak seçilmelidir. Hem mutant, hemde mutant olmayan hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetleri ve ekspresyon süresi boyunca hücrenin en iyi şekilde yetişmesini sağlaması açısından seçilmesi gerekli olan kültür koşulları özellikle önemlidir.

1.4.1.3. Kültürlerin hazırlanması

Hücreler stok kültürlerden oluşturulurlar, kültür ortamlarına ekilir ve 37°C derecede inkübasyon yapılır. Bu testte kullanılmadan önce, kültürler önceden var olan mutant hücrelerin temizlenmesi gerekir.

1.4.1.4. Metabolik aktivasyon

Hücreler test maddesine uygun metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda maruz kalmalıdırlar. En yaygın kullanılan sistem Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) veya fenobarbiton ve ß–naftoflavon birleşimi (19)(20) enzim indükleyici ajanlarla muamele edilen kemirgenlerin karaciğerlerinden elde edilen kofaktör-destekli post-mitokondriyal kısımdır.

Post-mitokondriyal kısım genellikle son test ortamında %1–10 v/v, konsantrasyon aralığında kullanılır. Metabolik aktivasyon sisteminin koşulları ve seçimi test edilen kimyasalın sınıfına bağlı olabilir. Bazı durumlarda, post-mitokondriyal kısma ait birden fazla konsantrasyon kullanılması uygun olabilir.

(Spesifik aktivasyon gösteren enzimleri ifade eden genetik olarak tasarlanmış hücre dizilerini içeren içsel, endojen aktivasyon için potansiyel sağlayabilir). Kullanılan hücre dizilerinin seçimi (örneğin test maddesinin metabolizması için sitokrom P450 izoenzim ilişkisiyle) bilimsel olarak doğrulanmalıdır.

1.4.1.5. Test maddesi/Hazırlama

Hücrelerin muamele edilmelerinden önce uygunsa, katı test maddeleri uygun çözücüler veya taşıyıcılar içinde çözünmeli veya askıda kalmalı ve seyreltilmedir. Sıvı test maddeleri muameleden önce test sistemlerine doğrudan eklenebilirler ve/veya seyreltilebilirler. Saklamanın kabul edilebilirliğini gösteren kararlılık verileri olmadıkça test maddesinin taze hazırlanmış çözeltileri uygulanmalıdır.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Çözücü/taşıyıcı

Çözücü/taşıyıcı, test maddesiyle kimyasal reaksiyona girmemeli ve hücrelerin sağkalımlarıyla ve S9 aktivitesiyle uyumlu olmalıdır. Çok iyi bilinen çözücüler/taşıyıcılar dışındakiler kullanılırsa, içerikleri uyumlu olduklarını gösteren verilerle desteklenmelidir. Mümkün olan yerlerde, sulu çözelti/taşıyıcı kullanılmasının ilk önce göz önünde bulundurulması tavsiye edilir. Suda kararsız olan maddeler test edilirken, kullanılan organik çözücülerde su olmamalıdır. Su, moleküler süzgeç ilave edilerek uzaklaştırılabilir.

1.4.2.2. Maruz kalma konsantrasyonları

En yüksek konsantrasyonu belirlerken dikkate alınması gereken kriterler arasında sito toksisite, test sistemindeki çözünürlük, pH veya ozmolalite değişiklikleri vardır. Sitotoksisite bağıl klonlama verimliliği (hayatta kalma) veya bağıl toplam büyüme gibi hücre bütünlüğü ve büyüme için uygun gösterimler kullanılarak asıl deneyde metabolik aktivasyonunhem varlığında hem de yokluğunda belirlenmelidir. Sitotoksisitenin ve çözünürlüğün bir ön deneyde belirlenmesi daha uygun olabilir.

Analiz edilebilen en az dört konsantrasyon kullanılmalıdır. Sitotoksisite olan yerlerde, bu konsantrasyonlar, en fazla toksisiteden, en az toksisiteye ya da hiçbir toksisite yaratmayan bir aralığa dahil olmalıdırlar, bu da genellikle konsantrasyon seviyeleri 2 ve $\sqrt{10}$ arasındakinden daha fazla olmayan bir faktörle ayrılmaları gerektiği anlamına gelir. En fazla konsantrasyon sitotoksisiteye sebep oluyorsa, o zaman yaklaşık %10-20 arasında (fakat % 10'dan az değil) bağıl sağkalım (bağıl klonlama verimliliği) veya bağıl toplam büyüme olmalıdır.
Nispeten sitotoksik olmayan olan maddeler için, maksimum test konsantrasyonu herhangi biri en düşük olacak şekilde 5 µl/ml, 5 mg/ml veya 0.01 M'dır.

Nispeten çözünemeyen maddeler, çözünebilirlik sınırlarına kadar veya bu sınırın altındaki kültür koşullarında test edilmelidir. Çözünmezliğin kanıtı hücrelerin maruz kaldığı en son muamele ortamında belirlenmelidir. Hücrelerin, S9, serum vs. varlığına bağlı olarak test sistemindeki maruz kalma boyunca çözünürlük değişeceğinden uygulamanın başındaki ve sonundaki çözünürlüğün tayin edilmesi uygun olabilir. Çözünmezlik çıplak gözle belirlenir. Çökelek, skorlamayı engellememelidir.

1.4.2.3. Kontroller

Eş zamanlı pozitif ve negatif (çözücü veya taşıyıcı) kontroller, metabolik aktivasyonunhem varlığında hem de yokluğunda her bir deneyde de yer almalıdır. Metabolik aktivasyon

kullanıldığında, pozitif kontrol kimyasalı, mutajenik cevap vermek için aktivasyonaihtiyaç duymalıdır.

Pozitif kontrol maddeleri içeren örnekler :

Metabolik aktivasyonun koşulu	Lokus	Madde	CAS No.	EINECS No.
Dış kaynaklı Metabolik Aktivasyonun Yokluğu	HPRT	Etil metansülfonat Etil nitroz üre	62-50-0 759-73-9	200-536-7 212-072-2
	TK (küçük ve büyük koloniler)	Metil metansülfonat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Etil metansülfonat Etil nitroz üre	62-50-0 759-73-9	200-536-7 212-072-2
Dış kaynaklı Metabolik Aktivasyonun Varlığı	HPRT	3-metilkolantren N-nitrozo dimetil amin 7,12-dimetilbenzantrasen	56-49-5 62-75-9 57-97-6	200-276-4 200-549-8 200-359-5
	TK (küçük ve büyük koloniler)	Siklofosfamid Siklofosfamid monohidrat Benzo[a]piren 3-metilkolantren	50-18-0 6055-19-2 50-32-8 56-49-5	200-015-4 200-028-5 200-276-5
	XPRT	N-nitrozo dimetil amin(S 9'un yüksek düzeyleri için) Benzo[a]piren	62-75-9 50-32-8	200-549-8 200-028-5

Diğer uygun pozitif kontrol kaynak maddeleri kullanılabilir. Örneğin bir laboratuvarın 5-Bromo 2'-deoksiüridine (CAS n. 59-14-3, EINECS n. 200-415-9), dayanan tarihsel verileri mevcutsa bu referans maddesi kullanılabilir. Mevcut olduğu durumlarda, kimyasal sınıfla ilişkili pozitif kontrol kimyasalların kullanımı üzerinde durulmalıdır. Negatif kontroller muamele ortamındaki çözücü veya taşıyıcıyı yalnız başına kapsamasını ve muamele gruplarıyla aynı şekilde muamele edilmesini içermelidir. Ayrıca, geçmişe dayalı kontrol verileri sağlığa zararlı veya mutajenik etkilerin, seçilen çözücüyle uyarıldığını göstermediği sürece muamele edilmemiş kontroller de kullanılmalıdır.

1.4.3. İşlem

1.4.3.1. Test maddesiyle muamele

Çoğalan hücreler test maddesine metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda maruz bırakılmalıdır. Maruz kalma, uygun bir zaman aralığında olmalıdır (genellikle üç-altı saat arası etkilidir). Maruz kalma zamanı bir veya daha fazla hücre döngüsü şeklinde genişletilebilir.
Test edilen her bir konsantrasyon için, ya çift sayıda ya da tek sayıda muamele edilmiş kültürler kullanılabilir. Konsantrasyon sayısı tekli kültürler kullanıldığında, analiz için uygun sayıda kültürleri sağlayabilmek için artırılmalıdır. (örneğin en az 8 analiz edilebilir konsantrasyon). Çiftli negatif (çözücü) kontrol kültürleri kullanılmalıdır.

Gaz veya uçucu maddeler, kapalı kültür kaplarının içinde olduğu gibi uygun yöntemlerle test edilmelidirler (21)(22).

1.4.3.2. Sağkalım, canlılık ve mutant frekansı ölçümleri

Maruz kalma süresinin sonunda, hücreler yıkanır ve sağkalımların belirlenmesi ve mutant fenotipinin ifade edilmesi için kültürlenirler. Kültürlerin bağıl klonlama verimliliğiyle (sağ kalım) veya kültürlerin bağıl toplam büyümesiyle belirlenen sitotoksisitenin ölçümü genellikle muamele süresi sonrasında başlatılır.

Yeni mutantların (HPRT ve XPRT'nin en az 6-8 güne, TK'nın en az 2 güne ihtiyacı vardır) en uyguna yakın fenotipik ifadelerinin ortaya çıkmasına izin verilmesi için her bir lokusun belirli süreye ihtiyacı vardır. Hücreler sırasıyla mutant sayısının ve klonlama verimliliğinin belirlenmesi için seçici ajanlarının bulunduğu ve bulunmadığı bir ortamda yetiştirilirler. (Mutant frekansını hesaplamak için kullanılan) yasayabilirlik ölçümü ekspresyon süresinin sonunda seçici olmayan ortamda başlatılır. Test maddesi L5178Y $TK^{+/-}$ testinde pozitifse, test kültürlerinin en az birinde (en yüksek pozitif konsantrasyon) ve negatif ve pozitif kontrollerde koloni boyutuna göre ayırma yapılmalıdır. Test maddesi L5178Y $TK^{+/-}$ testinde negatifse, negatif ve pozitif kontrollerde koloni boyutuna göre ayırma yapılmalıdır. TK6$TK^{+/-}$ kullanılan çalışmalarda da ayrıca koloni boyutuna göre ayırma yapılabilir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Veriler, muamele edilmiş ve kontrol kültürleri için sitotoksisite ve yaşayabilirlik belirlemelerini, koloni sayımlarını ve mutant frekanslarını içermelidir. L5178Y $TK^{+/-}$ testinde pozitif cevap varsa, koloniler test maddesinin en az bir konsantrasyon değeri için (en yüksek konsantrasyon) ve negatif ve pozitif kontrollerde oluşturulan küçük ve büyük kolonilerin kriterlerine uygun şekilde sayılırlar. Hem küçük hem de büyük koloni mutantların molekül ve hücresel genetik özellikleri detaylı olarak araştırılmalıdır. (23)(24). $TK^{+/-}$ testinde koloniler normal büyüme(büyük) ve yavaş büyüme (küçük) kolonilerinin kriterleri kullanılarak sayılırlar (25). En geniş genetik hasara sahip mutant hücrelerin ikiye katlanma zamanları uzamıştır ve bu yüzden küçük koloniler oluştururlar. Bu hasar tipik olarak genin tamamen kaybı ile hücre kromozomlarının gösterdiği türe has durum olarak görünen kromozom bozuklukları aralığında yer alır. Küçük koloni mutantlarının indüksiyonu büyük kromozom bozukluklarını indükleyen kimyasallarla ilişkilidir (26). Daha az etkilenen mutant hücreler ana babaya ait hücrelere benzer hızlarda büyürler ve büyük koloniler oluştururlar.

Sağkalım (bağıl klonlama verimlilikleri) veya bağıl toplam büyüme verilmelidir. Mutant frekansı, sağkalan hücrelerin sayısı başına düşen mutant hücrelerin sayısı olarak ifade edilmelidir.

Her bir kültür verisi ayrı ayrı sağlanmalıdır. Ek olarak, bütün veriler tablo halinde özetlenmelidir.

Net bir pozitif cevabın doğrulanmasına gerek yoktur. Belirsiz sonuçlar ilave testlerle, tercihen deneysel koşullar modifiye edilerek netleştirilmelidir. Negatif sonuçların vaka vaka

doğrulanması gerekir. Negatif sonuçların teyit edilmesine gerek olmayan durumlarda, gerekçe sağlanmalıdır. Takip eden deneylerde çalışma parametrelerinin değişikliği, değerlendirilen koşulların aralıklarının genişletilmesi, üzerinde düşünülmelidir. Konsantrasyon aralıkları ve metabolik aktivasyon koşulları modifikasyon yapılabilecek çalışma parametreleri arasındadır.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Pozitif sonuç tayin etmek için konsantrasyona bağlı artış veya mutant frekansında çoğaltılabilir artış gibi, bazı kriterler vardır. Sonuçlar ilk önce biyolojik açıdan değerlendirilmelidir. İstatiksel yöntemler, test sonuçlarını değerlendirirken yardımcı olarak kullanılabilir. İstatiksel değer pozitif bir cevap için tek belirleyici etken olmamalıdır.

Sonuçları yukarıdaki kriterleri karşılamayan bir test maddesinin bu sistemde mutajenik olmadığı düşünülür.
Her ne kadar pek çok çalışma açıkça pozitif ya da negatif sonuçlar verecekse de, nadir durumlarda veri kümeleri test maddesinin aktivitesi hakkında net bir karar verilmesine engel olabilir. Sonuçlar deneyin tekrarlanma sayısından bağımsız olarak şüpheli ve belirsiz olabilir.

In vitro memeli hücresi gen mutasyon testinden elde edilen pozitif sonuçlar, test maddesinin kullanılan kültürlenmiş memeli hücrelerinde gen mutasyonlarını indüklediğine işaret eder. Tekrarlanabilir pozitif bir konsantrasyon-cevap en anlamlısıdır. Negatif sonuçlar test koşulları altında test maddesinin, kullanılan kültürlenmiş memeli hücrelerinde gen mutasyonlarını indüklemediğine işaret eder.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Çözücü/Taşıyıcı
- taşıyıcı/çözücü seçimi için gerekçe;
- biliniyorsa, test maddesinin çözücü/taşıyıcı içindeki çözünürlüğü ve kararlılığı;

Hücreler:
- hücrelerin kaynağı ve türü;
- hücre kültürlerinin sayısı;
- uygulanabiliyorsa, hücre pasajları sayısı;
- uygulanabiliyorsa, hücre kültürü elde etme yöntemleri;
- mikoplazmanın yokluğu;

Test koşulları:
- konsantrasyonlar ve içerilen kültürlerin sayısının seçimi için gerekçe, örneğin mevcutsa, sitotoksisite verileri ve çözünürlük sınırlamaları;
- ortamın bileşimi, CO2 konsantrasyonu ;
- test maddesinin konsantrasyonu;
- taşıyıcının ve eklenen test maddesinin hacmi;
- inkübasyon sıcaklığı;

- inkübasyon süresi;
- muamele süresi;
- muamele sırasındaki hücre yoğunluğu;
- kabul edilebilirlik kriteri de dahil, metabolik aktivasyonsisteminin türü ve bileşimi;
- pozitif ve negatif kontroller;
- ekspresyon süresinin uzunluğu (ekilen ve altkültürlenen hücre sayısı ve besleme programı, eğer uygunsa dâhil edilir);
- seçici ajanlar;
- çalışmaların pozitif, negatif veya belirsiz olup olmadığının anlaşılma kriterleri
- canlı ve mutant hücrelerin sayılarını belirtmek için kullanılan yöntemler.
- büyüklüğü ve türü üzerinde durulan kolonilerin tanımları (uygunsa, "küçük" ve "büyük" koloni kriterleri de dâhildir).

Sonuçlar:
- toksisite belirtileri,
- çökelti belirtileri;
- belirlenebiliyorsa, test maddesinin maruz kalma süresince ozmolalite ve pH verileri;
- en az negatif ve pozitif kontroller için sayıldıysa koloni büyüklüğü;
- küçük koloni mutantlarını L5178Y TK+/- sistemiyle tespit etmek için laboratuvarın uygunluğu, uygun yerlerde;
- doz/cevap ilişkisi, mümkün yerlerde;
- istatistiksel analiz, varsa;
- eş zamanlı negatif (çözücü/taşıyıcı) ve pozitif kontrol verileri
- tarihsel negatif (çözücü/taşıyıcı) ve pozitif kontrol verileri, aralıklar, ortalamalar ve standart sapmalarla birlikte
- mutant frekansı.

Sonuçların tartışılması.

Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
(2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
(3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Timidin Kinaz Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467-485.
(4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394-403.
(5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.
(6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. And Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working

Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 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, 225-251.

(9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

(10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135- 141.

(11) Liber, H.L., Yandell, D.W and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

(13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK+/- - TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of 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 Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, 61-108.

(18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173-215.

(19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, 795-801.

(23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Timidin Kinaz Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 51-55.

(24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorotimidin-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 161-174.

(25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, 89-102.

(26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small- Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, 609-614.

B.18 DNA HASARI VE ONARIMI – MEMELİ HÜCRELERİNDE IN VITRO PROGRAMLANMAMIŞ DNA SENTEZİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Programlanmamış DNA Sentezi (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) testi, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu hasarlı bölgeyi içeren DNA uzantısının kesildikten ve uzaklaştırıldıktan sonra DNA onarım sentezini ölçer. Test, hücre döngüsünün S-fazında olmayan memeli hücrelerinin DNA'sına (trityumla işaretli timidinin (^{3}H-TdR) birleştirilmesine dayanır. ^{3}H-TdR alımı, muamele edilen hücre DNA' larının otoradyografisiyle veya sıvı sintilasyon sayılmasıyla (Liquid Scintillation Counting, LSC) belirlenebilir. Kültürdeki memeli hücreleri birincil sıçan karaciğer dokusunu oluşturan hücreler kullanılmadığı sürece, dış kaynaklı metabolik aktivasyon sistemi olmadan test maddesiyle muamele edilirler. UDS ayrıca in vivo sistemlerde de ölçülebilir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlaması

Hazırlıklar

Test kimyasalları ve kontrol veya referans maddeler yetiştirme ortamında hazırlanmalı veya uygun taşıyıcılarda çözünmeli veya süspansiyon haline getirilmelidir ve daha sonra çalışmada kullanmak üzere yetiştirilme ortamında seyreltilmelidir. Taşıyıcının son konsantrasyonu hücrenin yaşayabilirliğini etkilememelidir.

Yöntemde, sıçan karaciğer dokusunu oluşturan hücreler, insan lenfositlerinin ilk kültürleri veya (insan diploid fibroblastları (bağ dokusunun ana hücresi) gibi) yerleşik hücre dizileri kullanılabilir.

Hücreler uygun metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda test kimyasalına maruz kalmalıdırlar.

Test koşulları

Kültürlerin sayısı

Otoradyografi için en az iki ve LSC UDS belirlemeleri için altı (veya bilimsel olarak doğrulandığında daha az) hücre kültürü her bir deneysel nokta için gereklidir.

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanımı

Metabolik aktivasyonile veya aktivasyon olmadan eş zamanlı pozitif ve negatif (muamele edilmemiş ve/veya taşıyıcı) kontroller her bir deneyde yer almalıdır.
Sıçan karaciğer hücresini oluşturan hücreler ile ilgili yöntem için, pozitif kontrollerin örnekleri 7,12- dimetilbenzantrasen (7,12- DMBA) veya 2-asetilaminofloren (2-AAF) içerir. Yerleşik olarak kullanılan hücre dizileri olduğu takdirde, 4-nitrokinolin-Noksit (4-NQO) metabolik aktivasyon olmadan yürütülen hem otoradyografik yöntem hem de LSC yöntemi için de pozitif kontrol örneğidir; N-dimetilnitrozamin metabolik aktivasyon sistemleri kullanıldığında pozitif kontrol bileşiğine bir örnektir.

Maruz kalma konsantrasyonları

Bir aralık üzerinde cevabını tanımlamak için test maddesinin yeterli çoklu konsantrasyonları kullanılmalıdır. En yüksek konsantrasyon bazı hücre üzerindeki zehirli etkileri ortaya çıkarmalıdır. Nispeten suda çözünmeyen bileşenler çözünürlük sınırına kadar test edilmelidirler. Suda serbestçe çözünen zehirli olmayan kimyasallar için, vaka vaka bakılarak test maddesinin bir üst test kimyasal konsantrasyonu belirlenmelidir.

Hücreler

Kültürlerin elde edilmesinde uygun çoğalma ortamı, CO_2 konsantrasyonu, sıcaklık ve nem sağlanması gerekir. Yerleşik hücre dizileri mikoplazma kontaminasyonu için düzenli olarak kontrol edilmelidir.

Metabolik aktivasyon

Bir metabolik aktivasyon sistemi birincil karaciğer dokusunu oluşturan hücre kültürleriyle birlikte kullanılmaz. Yerleşik olarak kullanılan hücre dizileri ve lenfositler uygun metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda test maddesine maruz bırakılırlar.

İşlem

Kültürlerin hazırlanması

Yerleşik hücre dizileri stok kültürlerden oluşturulurlar (örneğin Tripsinizasyonla veya çalkalayarak) uygun yoğunluktaki kültür kaplarının içine ekilir ve 37 °C derece sıcaklıkta inkübasyon yapılır.

Sıçan hepatositlerinin kısa dönemli kültürleri, uygun bir ortamda yeni ayrılmış karaciğer dokusunu oluşturan hücrelerin kendilerini büyüme yüzeyine tutturmalarıyla oluşturulur. İnsan lenfosit kültürleri uygun teknikler kullanılarak oluşturulur.

Kültürlerin test maddesiyle muamele edilmesi

Birincil sıçan karaciğer dokusunu oluşturan hücreler (hepatositler)

Yeni izole edilen sıçan hepatositleri ^{3}H-TdR içeren bir ortamda uygun bir zaman süresince test maddesiyle muamele edilirler. Muamele sürecinin sonunda, ortam hücrelerden arındırılmalı, durulanmalı, sabitlenmeli ve kurutulmalıdır. Lamlar otoradyografik emülsiyona daldırılmalı (alternatif sıyırma filmleri kullanılabilir), maruz bırakılmalı, geliştirilmeli, boyanmalı ve sayılmalıdır.

Yerleşik hücre dizileri ve lenfositler

Otoradyografik teknikler: Hücre kültürleri ^{3}H-TdR ile uygulamayı takiben uygun sürelerle test maddesine maruz bırakılırlar. Zaman, maddenin doğası, metabolize eden sistemlerin aktivitesi ve hücre tipleriyle ayarlanır. 3H-TdR, UDS piklerini tayin etmek için ya test maddesiyle eş zamanlı ya da test maddesine maruz kaldıktan sonraki birkaç dakika içinde ilave edilmelidir. İki işlem arasındaki seçim test maddesi ve ^{3}H-TdR arasındaki olası etkileşimlerden etkilenecektir. UDS ve yarı-korunumlu (semi-consevative) DNA replikasyonunu ayırt etmek için örneğin arjinin eksikliği bulunan bir ortam kullanılarak, düşük serum içeriği veya kültür ortamındaki hidroksi üreyle daha sonra engellenebilir.

UDS'nin LSC ölçümleri: Test maddesiyle muamele edilmeden önce, hücrelerin S-fazına girmesi yukarıda tarif edildiği gibi baskılanmalıdır; hücreler otoradyografide tanımlandığı gibi test kimyasalına maruz kalmalıdırlar. İnkübasyon süresinin sonunda, DNA hücrelerden ekstrakte edilmemeli ve toplam DNA içeriği ve ^{3}H-TdR uzantısı birlikte belirlenmelidir.
Yukarıdaki tekniklerde insan lenfositleri kullanıldığı zaman, yarı-korunumlu DNA eşleşmesinin baskılanmasının, uyarılmamış kültürlerde gereksiz olduğu not edilmelidir.

Analiz

Otoradyografik belirlemeler

Kültür hücrelerindeki UDS'yi belirlemek için, S-fazındaki çekirdekçik sayılmaz. Konsantrasyon başına en az 50 hücre sayılmalıdır. Lamlar sayılmadan önce kodlanmalıdır. Her bir lamdaki ayrı ayrı genişçe ayrılan alanlar sayılmalıdır. Sitoplâzmada birlikte bulunan ^{3}H-TdR nin miktarı ve sayılan her hücrenin sitoplâzmasındaki üç çekirdek büyüklüğündeki alan sayılarak belirlenmelidir.

LSC belirlemeleri

Her bir konsantrasyonda ve LSC UDS tayinlerinin kontrollerinde, uygun sayıda kültür kullanılmalıdır.

Bütün sonuçlar bağımsız bir deneyle doğrulanmalıdır.

2. VERİLER

Veriler çizelge halinde sunulmalıdır.

2.1. Otoradyografik belirlemeler

^{3}H-TdR birlikteliğinin sitoplâzmadaki uzantısı ve hücre çekirdeği üzerinde bulunan tohumların sayısı ayrı ayrı kaydedilmelidir.

Ortalama, medyan ve mod sitoplâzmadaki ^{3}H-TdR birlikteliğinin uzantısının dağılımını ve çekirdek başına düşen tohumların sayısını tanımlamak için kullanılabilir.

2.2. LSC belirlemeleri

LSC belirlemeleri için ^{3}H-TdR birleşmesi dpm/µg DNA olarak rapor edilmelidir. Ortalama dpm/µg DNA standart sapmayla birlikte birleşmelerin dağılımını tanımlamak için kullanılır. Veriler uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmelidir

3. 3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan hücreler, yoğunluk ve uygulama zamanındaki kısım numarası, hücre kültürlerinin sayısı,
- ortam, sıcaklık ve CO2 konsantrasyonuyla birlikte hücre kültürlerinin korunması için kullanılan yöntemler,
- test maddesi, taşıyıcı, konsantrasyonlar ve yöntemde kullanılan konsantrasyonların seçilme gerekçesi,
- metabolik aktivasyon sistemlerinin detayları,
- uygulama programı
- pozitif ve negatif kontroller,
- kullanılan otoradyografik teknik,
- hücrelerin S-fazına girmesini engelleyen işlemler,
- DNA ekstraksiyonundaki ve LSC tayinindeki toplam DNA içeriğinin tayininde kullanılan işlemler,
- mümkün olan durumlarda doz/cevap ilişkisi,
- istatistiksel değerlendirilme,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B. 19. IN VITRO KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange, SCE) analizi, kopyalanan kromozomların iki kardeş kromatidleri arasındaki DNA nın karşılıklı değişmelerinin belirlendiği bir kısa dönem testidir. SCE'ler, görünüşte homolog lokuslarda (bir genin kromozom üzerinde bulunduğu nokta) olan DNA kopyalanması ürünlerindeki değişmeleri gösterir.

Değişim işlemi molekül temeli hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, tahminen DNA kırılması ve birleşmesini içerir. SCE'lerin belirlenmesi, kardeş kromatidlerin farklı olarak işaretlenmesini gerektirir ve bu da iki hücre döngüsü için kromozomal DNA'ya bromodeoksiuridin (BrdU) ilave edilerek sağlanabilir. Uygunsa in vitro memeli hücreleri dış kaynaklı metabolik etkinleştirici sistem olmadan, test kimyasalına maruz kalırlar ve BrdU içeren ortamda iki devir kopyalama için kültürlenirler. Mitozun metafaz benzeri bir aşamasında (c-metafaz) hücrelerin birikmesi için kromozomların iplikcik haline geçmesini engelleyen maddeyle (örneğin kolşisin) muamele edildikten sonra hücreler harmanlanır ve kromozom ile ilgili hazırlıkları yapılır.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlaması

Hazırlıklar

-Birincil kültürler, (insan lenfositleri) veya yerleşik olarak kullanılan hücre dizileri (örneğin hamster yumurtalık hücreleri) denemede kullanılabilir. Hücre dizileri Mikoplazmadaki istenmeyen kontaminasyonlar için kontrol edilmelidir.

-Uygun kültür ortamı ve inkübasyon koşulları (sıcaklık, kültür kapları, CO_2 derişimi,ve nem) kullanılmalıdır,

-Test maddeleri kültür ortamında hazırlanabilir veya hücrelere uygulanmadan önce uygun taşıyıcı içinde çözünebilir veya askıda kalabilir. Kültür sistemindeki taşıyıcının son derişimi hücrenin yaşayabilirliğini veya büyüme hızını anlamlı olarak etkilememeli ve SCE sıklığındaki etkiler çözücü kontrolüyle izlenmelidir,

- Hücreler dış kaynaklı bir memeli metabolik aktivasyon sistemin hem varlığında hem de yokluğunda test maddesine maruz kalmalıdırlar. Alternatif olarak, esas metabolik aktivite ile kullanılan hücre türlerinin aktivitesinin hızı ve doğası test edilen kimyasal sınıfına uygun olmalıdır.

Test koşulları

Kültürlerin sayısı

Her bir deneysel nokta için en az çift kültürler kullanılmalıdır.

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanımı

Hem doğrudan rol oynayan bileşiklerin hem de metabolik aktivasyon gerektiren bileşiklerin kullanıldığı pozitif kontroller her deneyde yer almalıdır; taşıyıcı kontrol ayrıca kullanılmalıdır:

Aşağıdaki maddeler pozitif kontrol olarak kullanılabilecek maddelere örnektir:
-direkt olarak rol oynayan bileşik:
-etilmetansülfonat,
-dolaylı olarak rol oynayan bileşik:
-siklofosfamid.

Uygun olduğunda, test edilen kimyasalla aynı kimyasal sınıfa ait ilave bir pozitif kontrol içermelidir.

Maruz kalma konsantrasyonları

Test maddesinin uygun şekilde ayrılmış en az üç konsantrasyonu kullanılmalıdır. En yüksek konsantrasyon zehir etkisi anlamlı olarak artırmalı ancak uygun hücre çoğalmasının meydana gelmesini de sağlamalıdır. Nispeten suda çözünmeyen maddeler uygun işlemler kullanarak çözünürlük sınırına kadar test edilmelidirler. Suda serbestçe çözünen toksik olmayan maddeler için, vaka vaka bakılarak bir üst test maddesinin konsantrasyonu belirlenmelidir.

İşlem

Kültürlerin hazırlanması

Yerleşik hücre dizileri stok kültürlerden oluşturulurlar (örneğin tripsinizasyonla veya çalkalayarak) uygun yoğunluktaki kültür kaplarının içine ekilir ve 37 °C derecede inkübasyon yapılır. Tek tabakalı kültürler için, kültür kabı başına düşen hücrelerin sayısı ayarlanmalıdır, böylece kültürler toplanma zamanında %50'den daha fazla birleşmezler. Alternatif olarak, hücreler süspansiyon kültürde kullanılabilir. İnsan lenfosit kültürleri uygun teknikler kullanılarak, heparinize kandan oluşturulur ve 37 °C derecede inkübasyon yapılırlar.

Uygulama

Büyümenin üstel aşamalarında olan hücreler uygun bir zaman evresinde test maddesine maruz kalırlar; pek çok durumda bir-iki saat etkili olabilir, fakat uygulama süresi belirli durumlarda iki tam hücre döngüsüne kadar uzatılabilir. Yeterli ve kendinden metabolik aktiviteye sahip olmayan hücreler metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda test kimyasalına maruz kalmalıdırlar. Maruz kalma süresinin sonunda, hücreler test maddesinden temizlenerek yıkanırlar ve BrdU varlığında iki replikasyon devri için kültürlenirler. Alternatif olarak işlem hücreleri iki hücre döngüsünün tam kültür süresinin tamamlanması için, eş zamanlı olarak test kimyasalına ve BrdU'ya maruz bırakılabilir.
İnsan lenfosit kültürleri yarı-uyumlu koşullarda muamele edilirler. Hücreler, ikinci muamele-sonrası bölünmede en duyarlı hücre döngüsü aşamalarında kimyasala maruz kalması sağlandıktan sonra analiz edilirler. BrdU ilave edilen bütün kültürler, BrdU-bulunan DNA'nın fotolizini en aza indirmek için hücreler harmanlanıncaya kadar karanlıkta veya parlak lambalardan gelen loş hale getirilmiş ışıkta tutulmalıdırlar.

Hücrelerin toplanması

Hücre kültürleri toplanmadan önce 1-4 saat arasında çubuk şeklinde engelleyicilerle (kolşisin, vs.) muamele edilir Her kültür kromozomların hazırlanması için ayrı ayrı harmanlanır ve işlem görür.

Kromozom hazırlama ve boyama

Kromozomların hazırlanması standart hücre genetiği teknikler kullanılarak yapılır. SCE'leri göstermek için lamların boyanması çeşitli tekniklerle yapılır. (ör. floresans artı Giemsa yöntemi).

Analiz

Analizi yapılan hücrelerin sayısı SCE'nin kendi kendine gerçekleşen kontrol frekansına dayanmalıdır. SCE için genelde, kültür başına en az 25 iyi-dağılmış metafazı analiz edilir. Lamlar analizden önce kodlanır. İnsan lenfositlerinde sadece 46 sentromer içeren metafazların analizi yapılır. Yerleşik hücre dizileri içinde sadece modal sayının metafazlarını içeren +/- 2 sentromer analiz edilir. SCE olarak sonuçlanan kararlı sentomerik anahtar olup olmadığı tanımlanır. Sonuçlar bağımsız bir deney ile doğrulanmalıdır.

2. VERİLER

Veriler tablo halinde sunulmalıdır. Her bir metafaz için SCE'lerin sayısı ve yine her bir metafaz için kromozom başına SCE'lerin sayısı tüm muamele edilen ve kontrol kültürleri için ayrı ayrı listelenmelidir.

Veriler uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan hücreler, hücre kültürü elde etme yöntemleri,
- test koşulları: ortamın bileşimi, CO2 derişimi, test maddesinin derişimi, kullanılan taşıyıcının, inkübasyon sıcaklığı, uygulama zamanı, kullanılan çubuk şeklinde engelleyici, derişimi ve onunla yapılan uygulamanın süresi, kullanılan memeli aktivasyon sisteminin türü, pozitif ve negatif kontroller,
- deneysel nokta başına düşen hücre kültürlerinin sayısı,
- lam hazırlama tekniğinin detayları
- analiz edilen metafaz sayısı (her bir hücre kültürü için ayrı ayrı verilen veriler),
- hücre ve kromozom başına düşen ortalama SCE sayısı (her bir hücre kültürü için ayrı ayrı verilen veriler),
- SCE sayımı için kriterler ,
- doz seçimi için gerekçe,
- uygulanabiliyorsa, doz-cevap ilişkisi,
- istatistiksel değerlendirilme,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması

3.2. Değerlendirme ve yorum

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.20. *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DACİNSİYETE BAĞLI ÇEKİNİK ÖLÜMCÜL TEST

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok

1.4. Test yönteminin ilkesi

Drosophila melanogaster kullanılarak yapılan cinsiyete bağlı çekinik öldürücü (Sex-Linked Recessive Lethal, SLRL) test, böceğin eşey bölgesindeki mutasyonlardan hem noktasal mutasyonları hem de küçük silinmeleri tayin eder. Bu test X-kromozomu üzerindeki 800 bölgede tarama yapabilen ileri bir mutasyon yöntemidir; Bu sayı X-kromozal bölgelerin %80'ine tekabul eder ve X-kromozomu yaklaşık olarak tüm haploid genomun ellide birini gösterir.

Drosophila melanogaster'in X-kromozomundaki mutasyonlar, mutant (genleri değişmiş) geni taşıyan erkeklerde fenotipik olarak ifade edilir. Hemizigot şartlarda mutasyonun ölümcül olduğu, heterozigot bir dişiden normalde üretilen iki sınıf yavrudan bir sınıfın erkek yavrulardan oluşmamasından anlaşılır. SLRL testi bu olguların, özellikle de işaretlenmiş ve düzenlenmiş kromozomlar açısından, avantaj taşır.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlaması

Hazırlıklar

Irklar

İyi tanımlanmış yabanıltıp soyların erkekleri ve Muller-5 soy dişileri kullanılabilir. Ayrıca çoklu değiştirilmiş X-kromozomuyla birlikte uygun olarak işaretlenmiş dişi ırklar da kullanılabilir.

Test maddesi

Test maddeleri suda çözünür olmalıdır. Suda çözünmeyen maddeler uygun taşıyıcılarda çözünebilir (örneğin etanol ve Tween-60 veya 80 karışımı) veya süspansiyon olarak kalabilir, daha sonra uygulamadan önce su veya tuzlu su içinde seyreltilirler. Dimetilsulfoksit in (DMSO) taşıyıcı olarak kullanımından kaçınılmalıdır.

Hayvanların sayısı

Test önceden belirlenen duyarlılık ve güce göre tasarlanmalıdır. Uygun kontrolde gözlenen kendiliğinden olan mutant tekrarlanma frekansı analiz edilmesi gereken muamele edilmiş kromozomların sayısını güçlü bir şekilde etkileyecektir.

Yönetim planı

Maruz kalma, enjeksiyon veya gaz ve buharlarla veya oral maruz kalma ile gerçekleşir. Test maddesinin verilmesi şeker çözeltisi içinde yapılabilir. Gerekli olduğunda, maddeler % 0,7'lik NaCl çözeltisinde çözünebilirler ve göğüs veya karın içine enjekte edilirler.

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanılması

Negatif (taşıyıcı) ve pozitif kontroller içermelidir. Ancak, uygun laboratuvar geçmiş kontrol verileri mevcutsa, eş zamanlı kontrollere gerek yoktur.

Maruz kalma seviyeleri

Üç maruz kalma seviyesi kullanılmalıdır. Ön değerlendirme için, test maddesinin bir maruz kalma seviyesi kullanılabilir, bu maruz kalma seviyesi ya en yüksek tolere edilebilir konsantrasyon ya da bazı toksisite belirtilerini ortaya çıkaran bir değerdir. En yüksek uygulaması mümkün olan konsantrasyona, toksik olmayan maddelerin maruz kalması için kullanılmalıdır.

İşlem

Yabani tip erkekler (üç veya beş günlük) test maddesiyle muamele görür ve Muller-5 ırkı veya başka uygun bir şekilde işaretlenmiş bakir dişilerle (çoklu değiştirilmiş X-kromozomlarıyla) ayrı ayrı çiftleştirilirler. Dişiler tüm üreme hücresi döngüsünü kapsamak için, yeni bakir olanlarla her iki-üç günde bir değiştirilirler. Bu dişilerin yavruları muamele zamanında olgun sperme orta ya da geç aşamada spermatitlere, erken spermatitlere, spermatozitlere ve spermatagonlara ilişkin öldürücü etkiler için sayılırlar. Yukarıdaki çaprazların heterozigot F1 dişilerinin kardeşleriyle ayrı ayrı (örneğin şişe başına bir dişi) çiftleşmesine izin verilir. F2 jenerasyonunda, her kültür mutasyona uğramamış yabani tip erkeklerin yokluğu için sayılırlar. Bir kültür ebeveyne ait X-kromozomlarında öldürücü özellik taşıyan F1 dişilerinden ortaya çıkıyor görünüyorsa (örneğin muamele edilmiş kromozomlu erkekler gözlenmez) bu dişinin aynı genotipteki kız çocukları öldürücülüğün bir sonraki nesilde tekrarlayıp tekrarlamayacağının anlaşılması için test edilmelidir.

2. VERİLER

Veriler test edilen X-kromozomlarının sayısını, kısır erkek sayısını ve her maruz kalma konsantrasyondaki öldürücü kromozom sayısıyla ve her bir çiftleşme süresindeki her bir muamele edilen erkek için öldürücü kromozom sayısını gösterecek şekilde, tablo haline getirilmelidir. Erkek başına düşen farklı büyüklükteki kümelerin sayıları rapor edilmelidir. Bu sonuçlar ayrı bir deneyle doğrulanmalıdır.
Cinsiyete bağlı çekinik öldürücü testlerin değerlendirilmesinde uygun istatistiksel yöntemler kullanılmalıdır.

Bir erkekten kaynaklanan çekinik öldürücülerin kümelenmesi göz önünde bulundurulmalı ve uygun istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir.

3. 3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- soy: kullanılan Drosophila stokları veya suşları, böceklerin yaşı, uygulama yapılan erkek sayısı, kısır erkek sayısı, yerleşik F2 kültürlerinin sayısı, kuşağı olmayan F2 kültürü sayısı, her bir üreme hücresi aşamasında saptanan öldürücü taşıyıcı kromozom sayısı,
- uygulama gruplarının büyüklüklerini belirleme kriterleri,
- test koşulları: uygulamanın detaylı tarifi ve örnekleme planı, maruz kalma seviyeleri, toksisite verileri, negatif (çözücü) ve pozitif kontroller, eğer uygunsa,
- ölümcül mutasyonları sayma kriterleri,
- mümkün olan durumlarda maruz kalma/etki ilişkisi,
- verilerin değerlendirilmesi,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.21. IN VITRO MEMELİ HÜCRESİ DÖNÜŞÜM TESTLERİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok

1.4. Test yönteminin ilkesi

Memeli hücre kültür sistemleri, in vivo kötü huylu dönüşümlere yol açan kimyasal maddelerin sebep olduğu fenotipik değişiklikleri in vitro belirlemek için kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan hücrelere C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, Fischer sıçanı dahildir ve testler hücre morfolojisindeki değişikliklere dayanır veya yarı-katı kompleks şeker jelindeki bağlanma yeri değişikliklerine odaklanır. Kanserojen kimyasallara maruz kalmayı takiben hücrelerdeki diğer morfolojik ve fizyolojik değişiklikleri tayin eden daha az kullanılan sistemler de mevcuttur. İn vitro test sonlanma noktalarının hiçbirinin kanserle mekanistik bir bağlantısı kurulmamıştır. Bazı test sistemleri tümör oluşumu hızlandırıcılarını belirleyecek yetkinliktedir. Sitotoksisite test maddesinin koloni oluşturma becerisi veya kültürlerin büyüme hızları üzerindeki etkisi ölçülerek belirlenebilir. Toksikoloji açısından anlamlı olan test kimyasalına maruz kalma sonucu hücrede ortaya çıkan zehirliliğin ölçülmesi dönüşümlerin hesaplanmasında kullanılamaz çünkü tüm denemelerdeki frekanslardan bazıları uzun süreli inkübasyon ve/veya yeniden kaplamaları gerektirebilir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Hücreler

Çeşitli hücre dizileri veya primer hücreler kullanılan dönüşüm testine bağlı olarak elde edilir. Araştırmacı testte uygulama yapılan hücrelerin, bilinen kanserojenlere maruz kalmasından sonra uygun fenotipik değişikliği gösterdiğine emin olunmalı ve test araştırmacısının laboratuarı da geçerlilik (validity) ve güvenilirlik konusunda kanıtlanmış ve belgelendirilmiş olmalıdır.

Ortam

Ortam ve deneysel koşullar kullanılan dönüşüm yöntemi için uygun olmalıdır.

Test maddesi

Test maddeleri kültür ortamında hazırlanabilir veya hücrelere uygulanmadan önce uygun taşıyıcı içinde çözünebilir veya askıda kalabilir. Kültür sistemindeki taşıyıcının son konsantrasyonu hücrenin yaşayabilirliği veya büyüme hızını veya dönüşüm sıklığını etkilememelidir.

Metabolik Aktivasyon

Hücreler uygun dış kaynaklı metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda test kimyasallarına maruz bırakılmalıdır. Alternatif olarak, özgün metabolik aktivasyonların kullanıldığı hücre türleri için, aktivitenin doğası test edilen kimyasalın sınıfına uygun olmalıdır.

Test koşulları

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanımı
Hem doğrudan bileşik gibi davranan hem de metabolik aktivasyon gerektiren bileşik kullanılan pozitif kontroller her bir deneyde de yer almalıdır; taşıyıcı kontrol grubu da ayrıca kullanılmalıdır

Aşağıdakiler pozitif kontrol olarak kullanılabilecek olan madde örnekleridir:
-doğrudan bileşik gibi davranan
-etilmetansülfonat,
-ß-propiyolakton,
-metabolik aktivasyon gerektiren bileşikler:
-2-asetilaminofloren,
-4-dimetilaminoazobenzen,
-7,12-dimetilbenzantrasen.

Uygun olduğunda, test edilen bileşikle aynı kimyasal sınıfta olan kimyasala ait ilave bir pozitif kontrol yapılmalıdır.

Maruz kalma konsantrasyonları

Test maddesinin çeşitli konsantrasyonları kullanılmalıdır. Bu konsantrasyonlar, konsantrasyona bağlı toksik etki meydana getirmeli, en yüksek konsantrasyonla düşük seviyede sağkalım, en düşük konsantrasyon seviyesinde de neredeyse negatif kontroldaki ile aynı sayıda sağkalım sağlamalıdır. Nispeten suda çözünmeyen maddeler uygun işlemlerle çözünürlük sınırına kadar test edilmelidirler. Suda serbestçe çözünen toksik olmayan maddeler için, duruma göre bakılarak test maddesinin bir üst konsantrasyonu belirlenmelidir.

İşlem

Hücreler, kullanılan test sistemine bağlı olarak uygun bir süre maruz bırakılmalıdırlar, maruz kalma uzamışsa bu durum ortam değişikliğiyle birlikte dozun (ve eğer gerekliyse, yeni

metabolik aktivasyon karışımının) yeniden verilmesini gerektirebilir. Yeterli özgün metabolik aktivasyona sahip olmayan hücreler metabolik aktivasyon sisteminin hem varlığında hem de yokluğunda test kimyasallarına maruz bırakılmalıdır. Maruz kalma süresinin sonunda hücreler test maddesinden arındırılırlar ve izlenmekte olan dönüştürülmüş fenotipin görülebileceği bir ortamda kültürlenirler ve dönüşüm sıklığı belirlenir. Tüm sonuçlar bağımsız bir deney sonucuyla doğrulanmalıdır

2. VERİLER

Veriler tablo halinde sunulmalıdır ancak kullanılan yönteme bağlı olarak, örneğin plaka sayımı, pozitif plakalar veya dönüştürülen hücre sayısı gibi çeşitli formlar alabilirler. Uygun yerlerde hayatta kalma kontrol düzeylerinin yüzdesi olarak ve dönüşüm sıklığı da hayatta kalan sayısı başına dönüştürülen sayısı olarak ifade edilmelidir. Veriler uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmelidir.

3. 3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan hücre türü, hücre kültürü sayısı, hücre kültürü hazırlama yöntemleri,
- test koşulları: test maddesinin konsantrasyonu, kullanılan taşıyıcı, inkübasyon zamanı, süresi ve uygulama frekansı, uygulama sırasındaki hücre yoğunluğu, kullanılan dış kaynaklı aktivasyon sisteminin türü, pozitif ve negatif kontroller, izlenen fenotipin özelliği, eğer uygunsa, kullanılan seçici sistem, doz seçimi için gerekçe,
- canlı ve dönüştürülmüş hücreleri birer birer saymak için kullanılan yöntem,
- istatiksel değerlendirme,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.22. KEMİRGENLERDE BASKIN ÖLÜMCÜL TEST

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok

1.4. Test yönteminin ilkesi

Baskın öldürücü etkiler embriyonik veya fetal (cenin ile ilgili) ölümlere neden olurlar. Bir kimyasal maddeye maruz kalma sonucu baskın ölümlerin başlaması, testteki hayvan türünün oluşum aşamasındaki dokularını etkilediğini gösterir. Baskın ölümlerin kromozom hasarlarına (kromozomlardaki yapısal veya sayısal anomaliler) bağlı olarak meydan geldiği genel kabul görmüştür. Dişiler de muamele edilmişse embriyonik ölüm de, toksik etkilerin sonucu olabilir.

Genellikle erkek hayvanlar test bileşiğine maruz bırakılırlar ve muamele edilmemiş bakir dişilerle çiftleştirilirler. Çeşitli üreme hücresi aşamaları sıralı çiftleşme aralıkları kullanılarak ayrı ayrı test edilebilir. Muamele grubundaki dişi başına ölü implantların artışı arda kalan kontrol grubundaki dişi başına ölü implantların artışı implatasyon sonrası kaybı yansıtır. implantasyon öncesi kayıp corpora lutea (sarı özdek) sayımlarına dayanarak veya muamele ve kontrol gruplarındaki dişi başına düşen toplam implantlar karşılaştırılarak tahmin edilebilir. Toplam baskın öldürücü etki, implantasyon öncesi ve sonrası kaybın toplamıdır. Toplam baskın öldürücü etkinin hesaplanması test grubundaki dişi başına düşen canlı implantların kontrol grubundakilerle karşılaştırılmasına dayanır. implant sayısında belli aralıkla azalma olması hücre öldürülmesinin (örneğin, spermatazoitlerin ve/veya spermatogonların) bir sonucu olabilir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Mümkün olduğunda, test maddeleri izotonik (ozmotik basınçları eşit olan) tuz çözeltisi içinde çözünmeli veya süspansiyon olarak kalmalıdır. Suda çözünmeyen kimyasallar uygun taşıyıcılar içinde çözünür veya süspansiyon olarak kalırlar. Kullanılan taşıyıcı, test

kimyasalıyla etkileşmemeli ve toksik etki meydana getirmemelidir. Test kimyasalı taze hazırlanmalı ve kullanılmalıdır.

Test koşulları

Yönetim planı

Test bileşiği genellikle yalnızca bir kere uygulanmalıdır. Toksikolojik bilgilere dayanılarak tekrarlı bir muamele planı uygulanabilir. Sıkça kullanılan yönetim planları ağıza yerleştirilen tüp ile yapılan veya periton kesesi içine yapılan enjeksiyondur. Diğer uygulama yolları da uygun olabilir.

Deney hayvanları

Test türü olarak sıçan veya fareler tavsiye edilir. Sağlıklı, cinsel açıdan olgunlaşmış hayvanlar rastgele muamele grubu olarak ayrılırlar.

Sayı ve cinsiyet

Değerlendirilmekte olan biyolojik karakterin varyasyonu da dikkate alınarak yeterli sayıda ve test maddesiyle muamele edilmiş erkek kullanılmalıdır. Seçilen sayı, belirleme öncesindeki tayin etme hassasiyetine ve önem derecesine bağlıdır. Örneğin tipik bir testte her bir doz grubundaki erkek sayısı çiftleşme aralığı başına 30 ve 50 dişiyi hamile bırakacak yeterlilikte olmalıdır.

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanımı

Genelde eş zamanlı pozitif ve negatif (taşıyıcı) kontroller her deneyde olmalıdır. Aynı laboratuvarda yakın zamanda yürütülen deneylerden kabul edilebilir pozitif kontrol sonuçları elde edildiğinde bu sonuçlar eş zamanlı bir pozitif sonuç yerine kullanılabilir. Pozitif kontrol maddeleri testin hassasiyetini göstermek için uygun düşük dozlarda kullanılmalıdır. (örneğin MMS, Periton kesesi içinde bulunacak şekilde (intraperitonal olarak), 10 mg/kilogram)

Doz seviyeleri

Normalde üç doz kullanılmalıdır. Yüksek doz toksisite belirtileri meydana getirir veya muamele edilen hayvanlarda doğurganlık azalır. Belli durumlarda, tek bir yüksek doz düzeyi yeterli olabilir.

Sınır testi

Toksik olmayan maddeler, 5 g/kilogram dozda tek bir uygulamayla veya 1 g/kilogram/gün dozda tekrarlı uygulamalarla test edilmelidir.

Yöntem

Çeşitli muamele seçenekleri mevcuttur. Test maddesinin tekli uygulanması yaygın olarak kullanılır. Diğer muamele planları da kullanılabilir. Her bir erkek, muameleden sonra uygun aralıklarla bir veya iki muamele edilmemiş bakir dişiyle ayrı ayrı çiftleştirilir. Dişiler en az bir oestrous (insan dışındaki memelilerde periyodik olarak gözlenen yüksek seks aktivitesi) döngüsü boyunca, vajinada sperm varlığıyla veya vajinal tampon varlığıyla anlaşılan çiftleşme gerçekleşinceye kadar erkeklerle birlikte bırakılmalıdır.

Muameleyi takip eden çiftleşme sayısı uygulama planı yapılarak sağlanır ve tüm üreme hücresi aşamalarının muamele sonrasında örnekleneceği kesinleştirilmelidir. Dişiler hamileliklerinin ikinci yarısında gözden çıkartılırlar ve rahme ait içeriklerle ölü ve canlı implantları belirlemek için incelenir. corpora lutea (sarı özdek) sayısını belirlemek için yumurtalıklar incelenebilir.

2. VERİLER

Veriler, erkek sayısını, hamile dişi sayısını, hamile olmayan dişi sayısını gösterecek şekilde tablo haline getirilmelidir. Her bir erkek ve dişinin kimliğini kapsayan her bir çiftleşmenin sonucu ayrı ayrı rapor edilmelidir. Her bir dişi için çiftleşme haftası, erkek tarafından alınan doz, canlı ve ölü implantların frekansı kaydedilmelidir.

Toplam baskın öldürücü etkinin hesaplanması test grubundaki dişi başına düşen canlı implantların kontrol grubundaki dişi başına düşen canlı implantlarla karşılaştırılmasına dayanır. Muamele grubundaki ölü implantların canlı implantlarla oranı, kontrol grubundaki oranla karşılaştırılarak analiz edilir ve implantasyon sonrası kayıp tayin edilir.

Veriler erken ve geç ölümler olarak kaydedilirse, tablolar bunu netleştirmelidir. İmplantasyon öncesi kayıp tahmin edilebiliyorsa, rapor edilmelidir. İmplantasyon öncesi kayıp corpora lutea sayısı ve implantların sayısı arasındaki uyumsuzluk veya uterus başına düşen ortalama implant sayısının kontrol çiftleşmelerine kıyasla azalması olarak hesaplanabilir.

Veriler uygun istatiksel yöntem kullanılarak değerlendirilmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- kullanılan deney hayvanının türü, ırkı, yaşı ve ağırlığı, deney ve kontrol grubundaki her iki cinsiyetteki hayvan sayısı,
- test maddesi, taşıyıcı, test edilen doz seviyeleri ve doz seçimi için gerekçe, negatif ve pozitif kontroller, toksisite verileri,
- yol ve muamele programı,
- çiftleşme programı,
- çiftleşmenin meydana geldiğini anlamak için kullanılan yöntem,
- gözden çıkarılma zamanları,
- baskın öldürücü durumu sayma kriterleri,
- uygulanabiliyorsa, doz-cevap ilişkisi,
- istatistiksel değerlendirme,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.23. MEMELİ SPERMATOGONAL KROMOZOM BOZUKLUĞU TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 483, Memeli Spermatogonal Kromozom Bozukluğu (Aberration) Testi'ne (1997) eşdeğerdir.

1.1. Giriş

İn-vivo memeli spermatogonal kromozom bozunma testinin amacı, memeli spermatogonal hücrelerinde yapısal kromozom bozukluklarına neden olan maddeleri belirlemektir (1)(2)(3)(4)(5). Yapısal bozukluklar kromozom veya kromatid olarak iki tip olabilir Kimyasal mutajenlerin (bozukluğa veya mutasyona neden olanlar) çoğuyla kromatid tipi bozunmaları eyleme geçirir, ancak kromozom tipi bozukluklarda da ayrıca meydana gelir. Bu yöntem sayısal kromozom bozuklukları için tasarlanmamıştır ve bu amaç için rutin olarak kullanılmaz. Kromozom mutasyonları ve ilgili olaylar insandaki pek çok genetik (kalıtımsal) hastalığın nedeni olabilir.

Bu testin spermatogonal eşey hücrelerindeki kromozom olaylarını ölçmesi ve bu yüzden eşey hücrelerindeki kalıtsal mutasyonların başlangıcını tahmin etmesi beklenir. Bu testte rutin olarak sıçanlar kullanılır. Bu in vivo (canlı organizmadaki) hücre genetiği ile ilgili test, spermatogonal mitozlardaki kromozom bozukluklarını tespit eder. Diğer hedef hücreler bu yöntemin konusu değildir. Spermatogonal hücrelerdeki kromatid-tipi bozuklukları belirlemek için, ilk mitotik hücre bölünmesini takiben, bu lezyonlar bir sonraki hücre bölünmesinde kaybolmadan yapılan muamele incelenmelidir. Muamele edilen hücreler spermatozit olduğunda diyakinezi-metafaz I'deki kromozom tipi bozukluklar için, muamele edilmiş spermatogonal kök hücrelerden ilave bilgi mayotik kromozom analizleriyle sağlanabilir.

Bu in vivo testi somatik hücre (eşey hücreleri dışında kalan yapısal hücreler) mutajenlerinin eşey hücrelerinde de aktif olup olmadığını araştırır. İlaveten spermatogonal testi, mutajenite zararlarının değerlendirilmesiyle ilgilidir ve in vivo metabolizma, farmakokinetik ve DNA-onarım işlemi gibi etkenlerin göz önünde bulundurulmasını sağlar. Testislerde çok sayıda spermatogon nesilleri bulunur ve bunlar kimyasal muamelesine duyarlıdır. Bu yüzden, tespit edilen bozukluklar, çok sayıda baskın farklılaşmış spermatogonal hücrelerle birlikte, muamele edilmiş spermatogonal hücre populasyonlarının (toplam sayılarının) toplam cevabını yansıtır. Testisteki pozisyonlarına bağlı olarak, farklı spermatogon nesilleri fiziksel ve fizyolojik Sertoli hücre engeli ve kan-testis engeli nedeniyle genel dolaşıma girmeyebilirler.

Test maddesinin veya reaktif metabolitinin hedef dokuya ulaşamadığına dair kanıt mevcutsa, bu testi kullanmak uygun değildir.

Ayrıca Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Kromatid-tipi bozukluk: Yapısal kromozom hasarı tekli kromatid kırılması veya kromatidler arası kırılma ve birleşme olarak ifade edilir.

Kromozom-tipi bozukluk: Yapısal kromozom hasarı, özdeş yerlerdeki her iki kromatidin kırılması veya kırılması ve birleşmesi olarak ifade edilir.

Boşluk (gap): bir kromatidin genişliğinden daha küçük genişlikte, minimum yanlış dizilimli kromatid akromatik (renksiz) bir doku bozukluğudur.

Sayısal bozukluk: kullanılan hücrelerin normal kromozom sayısındaki değişiklikler.

Poliploidi: haploid kromozom sayısının (n) diploid sayı haricindeki bir sayıyla çarpımı (örneğin, 3n, 4n, ve diğerleri).

Yapısal bozukluk: Kromozom yapısında, hücre bölünmesinin metafaz aşamasının mikroskobik incelemeyle saptanabilen değişikliktir; silinmeler, ara ve iç değişiklikler olarak gözlenir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Hayvanlar test maddesine uygun bir yolla maruz kalırlar ve muamele edildikten sonra uygun zamanlarda gözden çıkarılırlar. Gözden çıkarılma öncesinde, hayvanlar metafaz-durdurucu maddelerle (örneğin, kolşisin (colchicine) veya kolsemid (colcemid®)) muamele edilir. Daha sonra üreme hücrelerinden kromozom karışımları yapılır ve boyanır, kromozom bozuklukları için metafaz hücreleri analiz edilir.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hazırlıklar

1.4.1.1. Hayvan türünün seçimi

Her ne kadar uygun herhangi bir memeli türünün erkekleri kullanılabilirse de fareler ve hamsterlar yaygın olarak kullanılır. Sağlıklı, genç yetişkin hayvanların yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşları kullanılmalıdır. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin % 20'sini geçmemelidir.

1.4.1.2. Barınma ve beslenme koşulları

Genel koşullar, Genel Giriş Kısım B'de belirtildiği şekilde uygulanır, nemlilik % 50–60 arasında olmalıdır.

1.4.1.3. Hayvanların hazırlanması

Sağlıklı genç yetişkin hayvanlar, rastgele kontrol ve muamele gruplarına ayrılırlar. Kafesler yerleştirilmelerinden kaynaklanacak olası etkileri en az indirecek şekilde yerleştirilirler. Hayvanlar ayrı ayrı kimliklendirilirler. Hayvanlar çalışma başlamadan en az beş gün önce laboratuvar koşullarına alıştırılırlar.

1.4.1.4. Dozların hazırlanması

Uygunsa, hayvanlara dozu uygulamadan önce, katı test maddeleri uygun çözücüler veya taşıyıcılar içinde çözünmeli veya dağıtılmalı ve seyreltilmelidir. Sıvı test maddeleri dozu

uygulamadan önce test sistemine doğrudan eklenebilirler ve/veya seyreltilebilirler. Kararlılığıyla ilgili veriler saklanmasının kabul edilebilirliğini göstermedikçe test maddesinin taze hazırlanmış olanları uygulanmalıdır.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Çözücü/Taşıyıcı

Çözücü/taşıyıcı kullanılan doz seviyelerinde toksik etki meydana getirmemelidir ve test maddesinin kimyasal reaksiyona gireceğinden şüphe duyulmamalıdır. Çok iyi bilinen çözücüler/taşıyıcılar dışındakiler kullanılırsa, içerikleri uyumlu olduklarını gösteren verilerle desteklenmelidir. Uygun olan her yerde sulu çözelti/taşıyıcının kullanılmasının düşünülmesi tavsiye edilir.

1.4.2.2. Kontroller

Eş zamanlı pozitif ve negatif (çözücü veya taşıyıcı) kontroller, her bir deneyde yer almalıdır. Test maddesiyle muamele haricinde, kontrol grubundaki hayvanlar muamele grubundaki hayvanlarla eşit şartlarda tutulmalıdırlar.

Pozitif kontroller arka planda tespit edilebilir artışlar göstermesi beklenen maruz kalma seviyelerinde spermatogonal hücrelerde in vivo yapısal kromozom bozuklukları meydana getirmelidir. Pozitif kontrol dozları etkilerin açıkça görülebileceği şekilde seçilebilir fakat işaretli lamların okuyucu tarafından hemen anlaşılabilmesini sağlamaz. Test maddesinin uygulandığından daha farklı şekilde uygulanan pozitif kontrol kabul edilebilirdir ve sadece tek seferde örnekleme yapılır. Ek olarak, uygun olduğunda, kimyasal sınıfla ilişkili pozitif kontrol kimyasallarının üzerinde durulabilir.

Pozitif kontrol maddelerin örnekleri, tablodakileri içerir:

Madde	CAS No.	EINECS No.
Siklofosfamid Siklofosfamid monohidrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Siklohekzilamin	108-91-8	203-629-0
Mitomisin C	50-07-7	200-008-6
Monomerik akrilamid	79-06-1	201-173-7
Trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Tek başına çözücüyle veya sadece taşıyıcıyla muamele edilmiş olan, aksi takdirde test gruplarıyla aynı şekilde muamele edilen negatif kontroller hayvanlar arasındaki değişkenlikler kabul edilebilir değilse ve geçmişten gelen kontrol verilerinde bozukluk bulunan kromozomların frekansı mevcut değilse, her örnekleme zamanında yer almalıdır. İlaveten, seçilen çözücü/taşıyıcı tarafından harekete geçirilen hiç bir zararlı veya mitojenik etki olmadığını gösteren tarihsel veya yayınlanmış kontrol verileri yoksa muamele edilmemiş kontroller kullanılmalıdır.

1.5. İşlem

1.5.1. Hayvan sayısı

Her bir muamele ve kontrol grubu analiz edilebilecek en az beş erkek hayvandan oluşmalıdır.

1.5.2. Uygulama planı

Test maddeleri tercihen bir veya iki seferde uygulanır (örneğin, tek uygulama olarak veya iki uygulama olarak). Fazla hacimli bir maddenin uygulanmasını kolaylaştırmak için test maddesi ayrıca bölünmüş doz, olarak uygulanabilir, örneğin aynı gündeki iki uygulama birkaç saati geçmeyecek şekilde ayrılabilir, olarak uygulanabilir. Diğer doz şekilleri bilimsel olarak doğruluğu gösterilmelidir.

En yüksek doz grubunda uygulamadan sonra iki örnekleme zamanı kullanılır. Hücre döngüsü kinetiği test maddesinden etkilenebileceğinden bir erken ve bir de geç örnek alım zamanları kullanılır, bunlarda uygulamadan yaklaşık 24 ve 48 saat sonradır. En yüksek doz dışındaki dozlar için örnekleme zamanı olarak etkilerin belirlenmesi için daha uygun bir örnek alma zamanı bilinmedikçe uygulamadan sonraki 24 saat veya 1.5 hücre döngüsünden sonra alınmalıdır(6).
İlaveten, diğer örnek alma zamanları da kullanılabilir. Örneğin kromozom izolasyonunu harekete geçiren veya S-bağımsız etkileri gösteren kimyasallar söz konusu olduğunda daha erken örnek alma zamanları uygun olabilir (1).

Tekrarlı uygulama planının uygunluğunun vaka vaka tanımlanması gerekir. Tekrarlı bir uygulamayı takiben hayvanlar son uygulamadan 24 saat (1,5 hücre döngüsü uzunluğu) sonra gözden çıkartılırlar. Uygun yerlerde ilave örnek alma zamanları da kullanılabilir.

Gözden çıkarılmadan önce, hayvanlara uygun dozda metafaz durdurucu madde (örneğin; Colcemid® veya colchicine) deri içine olacak şekilde enjekte edilir. Daha sonra uygun aralıklarla hayvanlardan örnek alınır. Fareler için bu aralık yaklaşık 3-5 saat; Çin hamsterları için bu aralık yaklaşık 4-5 saattir.

1.5.3. Doz seviyeleri

Elde hiç uygun veri bulunmadığı için aralık bulma çalışması yürütülürse, ana çalışmada kullanılanla aynı laboratuvar, aynı ırk, cinsiyet ve muamele kürü kullanılarak yürütülmelidir (7). Eğer toksisite varsa, ilk örnek alma zamanı için üç doz kullanılır. Bu doz seviyeleri maksimumla çok az toksisitenin olduğu veya hiç toksisitenin olmadığı aralığın içinde olmalıdır. Daha sonraki örnek alma zamanında en yüksek dozun kullanılması gerekir. En yüksek doz, toksisite belirtilerinin oluşmaya başladığı doz olarak tanımlanır ve daha yüksek doz seviyelerinin, aynı doz uygulama kürüne dayanarak, ölüme neden olması beklenir.

Düşük seviyeli toksik olmayan dozlarda özel biyolojik aktivite gösteren (hormonlar ve mitojenler gibi) maddeler doz belirleme kriterlerinde istisna olabilir ve duruma göre değerlendirilmelidir. En yüksek doz ayrıca spermatogonal hücrelerde (örneğin; spermatogonal mitozların birinci ve ikinci mayotik metafaza oranında düşme, bu düşüş % 50'yi geçmemelidir) bazı toksisite belirtileri meydana getiren doz olarak da tanımlanabilir.

1.5.4. Sınır testi

En az 2000 mg/kg vücut ağırlığı doz seviyeli bir sınır testi tek doz veya aynı günde iki muamele olarak uygulandığında gözlenebilen herhangi bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve yapısal olarak benzer maddelerle ilgili genetik yapı üzerinde bir toksisite beklenmiyorsa, bu durumda üç doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. Beklenen insan maruz kalımı, sınır testinde daha fazla doz kullanılması gerektiğine işaret edebilir.

1.5.5. Dozların uygulanması

Test maddesi genellikle gavaj yöntemi kullanılarak sondayla veya uygun bir boru sonda kullanılarak veya deri içine enjeksiyonla uygulanır. Diğer maruz kalma yolları gerekçelendirildiklerinde kabul edilir olabilir. Sonda veya enjeksiyonla tek seferde uygulanabilecek olan maksimum sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim 2 ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir. Bu değerden daha yüksek hacimler gerekçelendirilmelidir. Normalde daha yüksek konsantrasyonlarda daha kötü etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için konsantrasyonun tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla, test hacmindeki değişkenler en aza indirilir.

1.5.6. Kromozom hazırlama

Gözden çıkarılmadan hemen sonra, bir veya her iki testisten de elde edilen hücre süspansiyonları hipotonik çözeltiye maruz bırakılırlar ve sabitlenirler. Daha sonra hücreler lamlara yayılır ve boyanırlar.

1.5.7. Analiz

Her bir test hayvanı için en az 100 iyi yayılmış metafaz analiz edilmelidir (örneğin; grup başına en az 500 metafaz). Bu sayı daha yüksek sayıda bozukluk gözlenirse düşürülebilir. Pozitif ve negatif kontrolleri de içeren tüm lamlar mikroskop altında incelenmeden önce ayrı ayrı işaretlenmelidir. Sabitleme işlemi genellikle kromozom kaybıyla birlikte metafazların bir kısmının kırılması ile sonuçlanır, sayılan hücreler $2n \pm 2$'ye eşit sayıda sentromer içermelidir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Her bir hayvana ait veriler tablo halinde sunulmalıdır. Deneysel birim hayvandır. Her bir hayvan için ayrı ayrı yapısal kromozom bozukluğu olan hücre sayısı ve hücre başına düşen kromozom bozukluğu sayısı değerlendirilmelidir. Farklı tipteki yapısal kromozom bozuklukları sayılarıyla ve frekanslarıyla kontrol ve muamele grupları için listelenmelidir. Eksiklikler ayrıca kaydedilir ve raporlanır fakat genelde toplam bozukluk frekansında yer almazlar.

Mitoz yanında mayoz gözlenirse, olası sitotoksik etki oluşturmak için hayvan başına 100 bölünen hücrenin düştüğü bir örnekte, spermatoganal mitozların birinci ve ikinci mayotik metafazlara oranı tüm muamele ve negatif kontrol hayvanları için sitotoksisitenin bir ölçüsü

olarak tayin edilir. Sadece mitoz gözlenirse, mitoz endeksi her bir hayvan için en az 1000 hücreyle belirlenmelidir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Pozitif sonuç tayin etmek için bozuk kromozomlu hücrelerin bağıl sayısındaki doza bağlı artış veya tek bir doz grubunda, tek bir örnek alma zamanında kromozomu bozuk hücrelerin sayısındaki net artış gibi bazı kriterler vardır. Sonuçlar ilk önce biyolojik açıdan değerlendirilmelidir. İstatistiksel yöntemler, test sonuçlarını değerlendirirken yardımcı olarak kullanılabilir (8). İstatistiksel anlamlılık pozitif bir cevap için tek belirleyici etken olmamalıdır. Belirsiz sonuçlar ilave testlerle tercihen deney koşullarının modifikasyonuyla netleştirilmelidir.

Sonuçları yukarıdaki kriterleri karşılamayan bir test maddesinin bu sistemde mutajenik (genetik bozukluğa neden olan) olmadığı düşünülür.

Her ne kadar pek çok çalışma açıkça pozitif ya da negatif sonuçlar verecekse de, nadir durumlarda veri kümeleri test maddesinin aktivitesi hakkında net bir karar verilmesine engel olabilir. Sonuçlar deneyin tekrarlanma sayısından bağımsız olarak şüpheli ve belirsiz olabilir.

İn vivo spermatogonal kromozom bozukluk testinden elde edilen pozitif sonuçlar bir maddenin test edilen türün eşey hücrelerindeki kromozom bozukluklarını indüklediğini gösterir. Negatif sonuçlar, test koşulları içinde, test maddesinin test edilen türün eşey hücrelerindeki kromozom bozukluklarını indüklemediğini gösterir. Test maddesinin veya metabolitinin genel dolaşıma veya belirli biçimde hedef dokuya ulaşma olasılığı tartışılmalıdır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Çözücü/Taşıyıcı
- taşıyıcı seçimi için gerekçe;
- biliniyorsa, test maddesinin çözücü/taşıyıcı içindeki çözünürlüğü ve kararlılığı;

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ ırk;
- hayvanların sayısı ve yaşı;
- kaynak, barınma koşulları, diyet. vs.;
- testin başında her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı, her bir grup için vücut ağırlığı aralığı, ortalama ve standart sapma dahildir;

Test koşulları:
- yapıldıysa, aralık-bulma çalışma verileri;
- doz seçimi için gerekçe;
- uygulama yolu için gerekçe;

- test maddesi hazırlanmasıyla ilgili detaylar;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- gözden çıkarılma zamanları için gerekçe;
- eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi konsantrasyonun (ppm) mevcut doza (mg/kg vücut ağırlığı/gün) çevrilmesi;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar;
- muamele ve örnek alma planıyla ilgili detaylı tanım;
- toksisite ölçümü yöntemleri;
- metafaz durdurucu maddelerin tanımı, konsantrasyonları ve muamele süreleri;
- lam hazırlama yöntemleri;
- bozuklukları sayma kriterleri;
- hayvan başına analiz edilen hücre sayısı;
- çalışmaları pozitif, negatif ve belirsiz olarak ayırma ölçütleri.

Sonuçlar:
- toksisite belirtileri;
- mitotik indeks;
- spermatogonal mitoz hücrelerin ilk ve ikinci mayotik metafazlara oranı;
- her bir hayvan için ayrı ayrı verilen bozukluk tipi ve sayısı;
- grup başına düşen toplam bozukluk sayısı;
- grup başına düşen bozukluklu hücre sayısı;
- uygun yerlerde, doz cevap ilişkisi;
- varsa, istatistiksel analiz;
- eşzamanlı negatif kontrol verileri;
- geçmişe yönelik negatif kontrol verileri, aralık, ortalama ve standart sapmayla birlikte;
- eşzamanlı pozitif kontrol verileri.
- görülebiliyorsa, plodideki değişiklikler;

Sonuçların tartışılması.

4. KAYNAKLAR

(1) Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonal Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson- Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B.24. FARE BENEK TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Bu, farede uygulanan, gelişmekte olan embriyoların kimyasala maruz kaldığı in vivo (canlı organizma içinde) bir testtir. Gelişmekte olan embriyolardaki hedef hücreler melanoblastlar ve hedef genler de tüylerin pigmentasyonunu (hücrelerin renkli madde oluşturması) kontrol eden genlerdir. Gelişmekte olan embriyolar bu kıl renk genlerinin bazıları için heterozigottur. Melanoblastlardaki böyle bir genin baskın kalıtsal gendeki değişime neden olan gendeki bir mutasyon veya baskın kalıtsal gendeki değişime neden olan genin kaybolması çekinik fenotipin kendi nesillerinden hücrelerde, meydana gelen farenin tüylerinde rengi değişmiş leke oluşturarak, görülmesi anlamına gelir. Bu lekelere veya beneklere, yani mutasyonlara sahip yavrular sayılır ve sadece çözeltiyle muamele edilen embriyolardan elde edilen yavruların arasındakilerle karşılaştırılır. Fare benek testi fetal hücrelerdeki tahmin edilen mutasyonların belirlenmesini sağlar.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar
Mümkün olduğu durumlarda, test kimyasalları izotonik tuz çözeltisinde çözülür veya askıda kalırlar. Suda çözünmeyen kimyasallar, uygun taşıyıcıların içinde çözünür veya askıda kalır. Kullanılan taşıyıcı test bileşiğiyle etkileşmemeli ya da toksik etki oluşturmamalıdır. Test kimyasallarının yeni hazırlanan çözeltileri kullanılmalıdır.

Deney hayvanları
T ırkı fareleri (nonagouti, a/a; çinçilla, pembe göz, $c^{ch}p/c^{ch}p$; kahverengi, b/b; seyrek, kısa kulak, d se/d se; benekli lekeli, s/s) ya HT ırkı (solgun, nonagouti, podi familyasından, pa a bp/pa a bp; bulanık gri, ln fz/ln fz; inci pe/pe) ya da C57BL (nonagouti, a/a) ile çiftleştirilir. NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) ve DBA (nonagouti, a/a; kahverengi, b/b; seyrek d/d) arasındaki gibi diğer uygun çaprazlamalar nonagouti yavruları oluşturmak için kullanılabilir.

Sayı ve cinsiyet
Yeterli miktarda hamile hayvan muamele edilir ve kullanılan her bir doz için uygun sayıda yavrunun sağ kalması sağlanır. Uygun numune büyüklüğü muamele edilen farelerde görülen benek sayısıyla ve kontrol verilerinin skalasıyla sağlanır. Negatif sonuç sadece dişilerden en az 300 yavru en yüksek dozla muamele edilip sayılırsa kabul edilebilir.

Negatif ve pozitif kontrol kullanımı
Sadece taşıyıcıyla muamele edilen farelerden elde edilen eşzamanlı kontrol verileri (negatif kontroller) mevcut olmalıdır. Aynı laboratuardan elde edilen tarihsel kontrol verileri, homojen oldukları varsayılarak, hassasiyeti artırmak için birleştirilebilir. Test kimyasalının mutajeniteye neden olduğu belirlenemezse, aynı laboratuardan yakın zamanda, bu testle mutajenite göstereceği bilinen bir kimyasalla muamele edilerek elde edilen pozitif kontrol veriler mevcut olmalıdır.

Uygulama yolu
Uygulama yolu, hamile dişilere genellikle oral intubasyon veya intraperitonal enjeksiyondur. Solunum yoluyla veya diğer yollarla uygulama da uygun durumlarda kullanılabilir.

Doz düzeyleri
Biri toksisite belirtileri veya yavru büyüklüğünde azalma sağlayan en az iki doz kullanılır. Toksik olmayan kimyasallar için pratik olarak uygulanabilecek maksimum doz kullanılmalıdır.

İşlem
Tek uygulama normalde hamileliğin 8,9 veya 10ncu günlerinde yapılır. 1nci gün vajinal tıkacın ilk gözlendiği gün olarak hesaplanır. Bu günler gebelikten sonra 7,25, 8,25 ve 9,25 günlerine karşılık gelir. Bu günlerin üzerindeki başarılı uygulamalar kullanılabilir.

Analiz
Yavrular kodlanır ve doğumdan üç ve dört hafta sonra benekler için sayılır. Benekler üç sınıfa ayrılırlar:

(a) hücre ölümü (WMVS) sonucu oluştukları öngörülenorta düzeyde 5 mm'lik beyaz benekler;

(b) yanlış farklılaşma sonucu oluştukları öngörülen meme, cinsel organ, boğaz, koltuk altı ve kasık, orta alınla ilişkili sarı, agouti-benzeri benekler,

(c) somatik mutasyon (RS) sonucu oluştukları öngörülen tabakada rastgele dağılmış renkli ve beyaz benekler,

Her üç sınıf sayılır fakat sadece sonuncusu, RS, genetikle ilgilidir. Ayırmada karşılaşılan problemler, örnek tüylerin florasan mikroskobu ile incelenmesiyle çözülebilir. Yavrulardaki belirgin büyük morfolojik (yapıya bağlı) anomaliler not edilmelidir.

2. VERİLER

Veriler sayılan yavruların ve bir veya daha fazla öngörülen somatik mutasyon beneklerinin toplam sayısı olarak sunulur. Muamele ve negatif kontrol verileri uygun yöntemlerle karşılaştırılır. Veriler ayrıca litre başına temel alınarak sunulurlar.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- çaprazlamada kullanılan suşlar,
- deney ve kontrol gruplarındaki hamile hayvan sayısı,
- deney ve kontrol grubundaki yavruların doğumdaki ve memeden kesilmedeki ortalama büyüklükleri,
- test kimyasalının dozları,
- kullanılan çözücü
- uygulamanın yapıldığı hamilelik günü,
- uygulama yolu
- yavruların toplam sayısı, deney ve kontrol gruplarındaki WMVS, MDS ve RS sayıları,
- büyük morfolojik anomaliler,
- uygun olduğunda, RS 'nin doz/cevap ilişkisi,
- istatistiksel değerlendirilme,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B. 25. FAREDE KALITIMSAL TRANSLOKASYON TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Farede kalıtımsal yer değiştirme testi, ilk neslin yavrularında ortaya çıkan memeli eşey hücrelerindeki yapısal ve sayısal kromozom değişikliklerini belirler. Belirlenen kromozom değişikliklerinin tipleri karşılıklı yer değiştirmelerdirve dişi nesiller dâhil edilirse, X kromozomu kaybolur.

Yer değiştirme taşıyıcıları ve XO-dişilerinin doğurganlıkları düşüktür, bu durum sitogenetik analizler için F1 soyunu seçmekte kullanılır. Tam kısırlık bazı tip yer değiştirmelerden (X-otozom ve c-t tipi) kaynaklanır. Yer değiştirmeler sitogenetik olarak erkeklerde ayrı ayrı diyakinezi-metafaz 1'in mayoz bölünme gösteren hücrelerinde, ya F1 erkeklerinde ya da F1 dişilerin erkek yavrularında gözlenir. XO-dişileri kemik iliği mitoz bölünmede sadece 39 kromozomun varlığıyla sitogenetik olarak tanımlanır

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar
Test kimyasalları izotonik tuz çözeltisinde çözülür. Eğer çözünmezlerse, uygun bir taşıyıcı içinde çözünür veya askıda kalırlar. Test bileşiklerinin çözeltileri, kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır. Dozun uygulanmasını kolaylaştırmak için bir taşıyıcı kullanılıyorsa, taşıyıcı test bileşiğiyle etkileşmemeli ya da toksik etki oluşturmamalıdır.

Uygulama yolu
Uygulama yolu genellikle ağızdan tüple veya deri içine enjeksiyondur. Diğer yollarla uygulama da uygun olabilir.

Deney hayvanları
Üremenin kolaylaştırılması ve sitolojik doğrulama için deneyler fareyle yürütülür. Özgün bir fare ırkına gerek yoktur. Ancak, ırkın ortalama bir batında doğan yavruların sayısı sekizden fazla ve nispeten sabit olmalıdır. Sağlıklı, cinsel olarak olgunlaşmış hayvanlar kullanılır.

Hayvan sayısı
Gerekli hayvan sayısı, kendiliğinden yer değiştirme frekansına ve pozitif sonuç için gerekli olan en düşük oluşma hızına bağlıdır.

Testler genellikle F1 erkek soyunun analizi ile gerçekleştirilir. Doz grubu başına en az 500 erkek F1 yavru kuşak test edilmelidir. Dişi F1 kuşak varsa, 300 erkek ve 300 dişiye gerek vardır.

Negatif ve pozitif kontrollerin kullanımı
Eş zamanlı ve tarihsel kontrollerden elde edilen uygun kontrol verileri mevcut olmalıdır. Aynı laboratuvarda yakın zamanda yürütülen deneylerden kabul edilebilir pozitif kontrol sonuçları elde edildiğinde bu sonuçlar eş zamanlı bir pozitif kontrol yerine kullanılabilir.

Doz

Genelde en az toksik etkinin oluşmasını sağlayan fakat üreme davranışını ve sağkalımı etkilemeyen en yüksek doz düzeyi test edilir. Doz-cevap ilişkisini oluşturmak için, daha düşük iki ayrı doza daha ihtiyaç vardır. Toksik olmayan kimyasallar için, uygulanabilen en yüksek doz kullanılmalıdır.

İşlem

Muamele ve çiftleşme

İki muamele programı mevcuttur. Test maddesinin tek seferde uygulanması yaygın olarak kullanılır. Test maddesinin 35 gün boyunca haftada yedi gün uygulaması da kullanılabilir bir yöntemdir. Muameleyi takip eden çiftleşme sayısı,muamelenin programlanmasıyla elde edilir ve muamele edilen tüm üreme hücresi aşamalarının örneklendirildiği kesinleştirilmelidir. Çiftleşme süresinin sonunda dişiler ayrı kafeslere yerleştirilirler. Dişiler doğum yaptığında, tarih, yavru büyüklüğü ve yavru kuşak cinsiyeti kaydedilir. Deneyde kullanılmayacaklarsa, bütün erkek yavru kuşaklar sütten kesilirler ve bütün dişi yavru kuşaklar atılırlar.

Yer değiştirme heterozigotluğu için test uygulanması

Olası iki yöntemden biri kullanılır:

-F1 yavru kuşağı doğurganlık testi ve sitogenetik analizle olası yer değiştirme taşıyıcılarının daha sonraki doğrulanması

- Erkek F1 yavru kuşakların doğurganlık testiyle ön seçim yapılmadan sitogenetik analizi

(a) Doğurganlık testi

F1'lerin doğurganlıklarının azalması bir batındaki yavru sayısının gözlenmesi ve/veya dişi döl yatağı (uterus) içeriklerinin analiziyle oluşturulabilir. Normal ve azalmış doğurganlığı belirleme kriterleri kullanılan fare ırkı için oluşturulmalıdır.

Bir batındaki yavru sayısının gözlenmesi: Test edilecek F1 erkekleri aynı deneydeki ya da kolonideki dişilerle birlikte ayrı ayrı kafeslere yerleştirilir. Kafesler çiftleşmeden 18 gün sonra başlayarak günlük olarak incelenir. F2 yavru kuşaklarının bir batındaki yavru sayısı ve cinsiyetleri doğumda kaydedilir ve sonrasında yavrular atılırlar. Dişi F1 yavru kuşaklar test ediliyorsa, bir batında az sayıda meydana gelen F2 yavru kuşakları ilave bir test için saklanır. Dişi yer değiştirme taşıyıcıları, kendi erkek döllerindeki yer değiştirmelerin sitogenetik analiziyle doğrulanırlar. XO-dişileri kendi yavru kuşakları arasındaki cinsiyet oranlarındaki 1:1 'den 1:2'ye erkek vs. dişi şeklindeki değişiklikle, seçilirler. Sıralı bir işlemde ilk F2 yavru normal değere ulaşır veya normal değeri geçerse, normal F1 hayvanları daha sonraki testlerden alıkonulurlar, aksi takdirde ikinci veya üçüncü F2 yavru gözlenir.

Üç F2 batına kadar gözlem yapıldıktan sonra, normal olarak sınıflandırılamayan F1 hayvanları ya dişi dölyatağı içeriği analiziyle ilave testlere tabi tutulurlar ya da doğrudan sitogenetik analiz yapılır.

Döl yatağı (uterus) içeriğinin analizi: Yer değiştirme taşıyıcılarının bir batındaki yavru sayısındaki düşüş embriyonik ölümlere bağlıdır. Bu yüzden ölü implantların çok sayıda olması test edilen hayvanlarda yer değiştirme varlığının göstergesidir. Test edilecek F1 erkeklerinin her biri iki ya da üç dişiyle çiftleştirilirler. Gebe kalma her gün sabahları vajinal kapakçığın kontrolü yapılarak saptanır. Dişiler, 14-16 gün sonra gözden çıkartılırlar ve döl yataklarındaki canlı ve ölü implantlar kaydedilir.

(b) Hücre genetiği analizi (sitogenetik analiz)

Testis preparatları hava ile kurutma tekniğiyle yapılır. Yer değiştirme taşıyıcıları birincil spermatositlerde diyakinezi-metafaz I'deki çok değerlikli konfigürasyonların varlığıyla tanımlanır. En az iki çok değerlikli iki hücrenin gözlenmesi test hayvanının yer değiştirici taşıyıcısı olduğuna dair gerekli kanıtı sağlar.

Hiç üreme seçimi yapılmamışsa, bütün F1 erkekleri sitogenetik olarak incelenir. Erkek başına en az 25 diyakinezi-metafaz I hücresi mikroskobik olarak sayılmalıdır. Spermatogonlarda veya kemik iliğinde mitotik metafazın incelenmesi küçük testisli ve diyakineziden önce mayotik kırılma gerçekleşen veya XO şühesi olan F1 dişilerinden olan F1 erkekleri için gereklidir. 10 hücrenin her birinde beklenmedik şekilde uzun ve/veya kısa kromozomların varlığı belirli erkek kısır yer değişikliği için kanıttır (c-t tipi).

Erkekte kısırlığa neden olabilen bazı X-otozom yer değiştirmeler, sadece mitotik kromozomların sarmal analizleriyle tanımlanabilirler. 10 mitozda da 39 kromozom bulunması, dişide XO varlığının kanıtıdır.

2. VERİLER

Veriler tablo halinde sunulmalıdır.

Doğumda ve sütten kesildiğinde ortalama bir batındaki yavru sayısı ve ebeveyn (erkek-dişi) çiftleşmelerinden gelen cinsiyet oranları her bir çiftleşme aralığı için rapor edilir.

F1 hayvanlarının doğurganlıklarının değerlendirilmesi için, tüm normal çiftleşmelerin ortalama bir batındaki yavru sayısı ve F1 yer değiştirici taşıyıcılarının ayrı ayrı her bir batındaki yavru sayıları gösterilir. Döl yatağı (uterus) içeriğinin analizi için, normal çiftleşmelerin canlı ve ölü implantlarının ortalama sayısı ve her bir F1 yer değiştirme taşıyıcısı için canlı ve ölü implantların ayrı ayrı sayısı rapor edilir.

diyakinezi-metafaz I'in sitogenetik analizleri için, çok değerlikli konfigürasyon tiplerinin sayısı ve hücrelerin toplam sayısı her bir yer değiştirme taşıyıcısı için listelenir.

Kısır F1'lerin her biri için, toplam çiftleşme sayısı ve çiftleşme süreleri rapor edilir. Testis ağırlıkları ve sitogenetik analiz belirtilir.

XO dişileri için, ortalama bir batındaki yavru sayısı, F1 yavru kuşak cinsiyet oranı ve sitogenetik analiz sonuçları rapor edilir.

Uygun yerlerde F1 yer değiştirici taşıyıcıları doğurganlık testleriyle önceden seçilirler. Tabloların bunların kaçının onaylanmış yer değiştirme heterozigotu olduğuna dair bilgileri içermesi gerekir.

Negatif kontroller ve pozitif kontrol deneylerinden elde edilen veriler rapor edilmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- farelerin ırkı, hayvanların yaşı, muamele edilen hayvanların ağırlıkları,
- deney ve kontrol gruplarında her bir cinsiyete ait ebeveyn (anne-baba olarak) hayvan sayısı,
- test koşulları, muamelenin detaylı tarifi, dozlar, çözücüler, çiftleşme programı,
- dişi başına düşen, döl sayısı ve cinsiyeti, yer değiştirme analizi için yetiştirilen döl sayısı ve cinsiyeti
- yer değiştirme analizlerinin süresi ve kriterleri
- yer değiştirme taşıyıcılarının sayısı ve açıklamalı tarifi, üreme ile ilgili veriler ve döl yatağı (uterus) içeriği verileri dahil, eğer uygulanabiliyorsa,
- sitogenetik işlemler ve mikroskobik analizlerin detayları, tercihen resimleriyle,
- istatistiksel değerlendirme
- sonuçların tartışılması
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

B.26. SUB-KRONİK ORAL TOKSİSİTE TESTİ - KEMİRGENLERDE TEKRARLANAN DOZDA 90 – GÜNLÜK ORAL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

Bu sub-kronik oral toksisite test yöntemi OECD TG 408 (1998)'e eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Kimyasalın toksik özelliklerinin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, tekrarlı dozlar verilerek sub-kronik oral toksisite belirlenmesi, akut veya 28-gün tekrarlı doz toksisite testlerinden kimyasalın toksisitesi hakkında başlangıç bilgisi elde edildikten sonra yapılmalıdır. 90 günlük çalışma sütten kesilme sonrası olgunlaşma ve yetişkinliğe ulaşıncaya kadarki büyümeyi de içine alan uzun bir zaman aralığında tekrarlı maruz kalmadan kaynaklanabilecek olası sağlık tehlikeleriyle ilgili bilgi sağlar. Çalışma ana toksik etkiler hakkında bilgi sağlayarak, hedef organlara ve birikim olasılığına işaret eder ve kronik çalışmalar için dozların belirlenmesinde ve insanın maruz kalması durumlarında, güvenlik kriterlerinin oluşturulmasında kullanılan, hiçbir olumsuz etkinin gözlenmediği dozun tahmin edilmesini sağlar.

Yöntem, nörolojik sonlanma noktaları üzerinde ilave vurgulara işaret eder ve bağışıklık sistemiyle ilgili etkilerle, üreme üzerindeki etkilere dikkat çeker. Hayvanların klinik gözlemlerinin dikkatlice yapılmasının gerekliliği, dolayısıyla mümkün olduğunca fazla bilginin elde edilmesi ayrıca vurgulanır. Bu çalışma, kimyasalların ileride daha detaylı araştırmaların yapılmasına ön ayak olacak olan nörotoksik (sinir sistemi üzerinde toksisite gösteren), immunolojik (bağışıklık sistemi üzerinde etki gösteren) veya üreme organı etkilerinin tanımlanmasına olanak sağlamalıdır.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Doz: Uygulanan test maddesinin miktarıdır. Doz ağırlık (g, mg) veya test hayvanının birim ağırlığı başına düşen test maddesi ağırlığı (örneğin, mg/kg) veya sabit diyet derişimi olarak (ppm) ifade edilir.

Dozaj: doz, doz frekansı ve doz uygulanma süresini içine alan genel ifadedir.

NOAEL: Olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviye.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi deney hayvanlarının muhtelif gruplarına oral yolla kademeli dozlarla, grup başına bir doz olacak şekilde, 90 gün boyunca uygulanır. Uygulama süresi boyunca hayvanlar toksisite belirtileri için yakından gözlenirler. Test sırasında ölen ya da öldürülen hayvanlara otopsi yapılır, ayrıca testin sonunda sağ kalan hayvanlar öldürülürler ve onlara da otopsi yapılır.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hayvanların hazırlanması

Laboratuvar koşullarına en az 5 gün uyum sağlamış sağlıklı hayvanlar ve daha önceden deneysel işlemlere maruz kalmayan, hayvanlar kullanılmalıdır. Test hayvanları tür, ırk, kaynak, cinsiyet, ağırlık ve/veya yaşlarına göre karakterize edilmelidirler. Hayvanlar kontrol ve uygulama gruplarına rastgele ayrılırlar. Kafesler, yerleştirilmelerinden meydana gelebilecek olası etkiler en aza indirilecek şekilde ayarlanmalıdır. Her hayvana kendisine özgü bir kimlik numarası verilmelidir.

1.4.2. Dozların hazırlanması

Test maddeleri sonda veya diyetle veya içme suyuyla uygulanır. Oral (ağız yolu ile) uygulama yöntemi bu çalışmanın amacına ve test maddesinin fiziksel/kimyasal özelliklerine bağlıdır.Gerekli olduğunda test maddesi çözülür veya uygun bir taşıyıcıda süspansyon haline getirilir. Uygun olan her yerde sulu çözelti/süspansiyon kullanımının ilk önce düşünülmesi tavsiye edilir, bunu yağda (örneğin, mısır yağı) çözelti/emülsiyon (dağılma şeklinde) kullanımı ve diğer taşıyıcılardaki olası çözelti kullanımı izler. Su dışındaki taşıyıcıların toksik özellikleri bilinmelidir. Test maddesinin uygulama koşullarındaki kararlılığı belirlenmelidir.

1.4.3. Test koşulları

1.4.3.1. Deney hayvanları

Tercih edilen tür sıçandır, ancak fare gibi diğer kemirgen türleri de kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan sağlıklı,genç,yetişkin laboratuvar suşlarına uygulama yapılır. Dişiler doğum yapmamış olmalı ve hamile olmamalıdırlar. Dozun uygulanması mümkün olabildiğince memeden kesildikten sonra başlamalıdır ve her koşulda hayvanlar 9 haftalıktan daha genç olmalıdırlar. Çalışmanın başında kullanılan hayvanların ağırlık değişiklikleri en az seviyede olmalı ve her cinsiyetin ortalama ağırlığının %20'sini geçmemelidir. Çalışma uzun süreli bir kronik toksisite çalışmasının ön çalışması olarak yürütülüyorsa, her iki çalışmada da aynı ırk ve kaynaktan hayvanlar kullanılmalıdır.

1.4.3.2. Sayı ve cinsiyet

Her bir doz için en az 20 hayvan (on dişi ve on erkek) kullanılmalıdır. Arada da hayvan öldürülmesi planlanıyorsa, çalışma tamamlanmadan önce,öldürülmesi planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır. Bir kimyasal ya da yakın bir benzeri ile ilgili daha önceki bilgilere dayanılarak, uygulama süresi sonrasında toksik etkilerin tersinirlikleri veya kalıcılıklarının gözlenebilmesi için kontrol ve en yüksek doz grubu için 10 (cinsiyet başına beş) hayvandan oluşan ilave bir ikincil grubun yer alması üzerinde düşünülmelidir. Muamele sonrasındaki bu sürenin uzunluğu gözlenen etkilere bağlı olarak uygun şekilde sabitlenmelidir.

1.4.3.3. Doz

Sınır testinin yürütüldüğü durumlar haricinde (bakınız 1.4.3.4), en az üç doz ve eş zamanlı kontrol kullanılır. Doz seviyeleri tekrarlı doz veya aralık bulma çalışmalarının sonuçlarına dayanabilir ve test bileşiğinin veya ilgili materyallerin metabolizması veya toksiko kinetiğiyle ilgili ilave bilgiler de dikkate alınmalıdır. Test maddesinin fizikokimyasal doğası veya

biyolojik etkileri tarafından sınırlanmadıkça, seçilecek en yüksek doz toksisiteye sebep olmalıdır fakat ölüm ve şiddetli rahatsızlıklara sebep olmamalıdır. Doz seviyelerinin azalan dizisi dozlamaya bağlı cevap veya olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviye (NOAEL) gösterecek şekilde seçilmelidir. İki –dört kat aralıklar azalan doz seviyeleri için genelde en uygunudur ve dördüncü bir test grubunun ilave edilmesi, doz grupları arasında geniş aralıklar kullanılmasına (örneğin, 6-10 kattan daha fazla) genellikle tercih edilir. Kontrol grubu, muamele edilmemiş bir kontrol grubu olmalı veya test maddesi uygulanırken taşıyıcı kullanılmışsa taşıyıcı-kontrol grubu olmalıdır. Test maddesiyle muamele edilenler hariç, kontrol grubundaki hayvanlar test grubundakilerle eşit koşullarda bulunmalıdır. Taşıyıcı kullanılmışsa, kontrol grupları kullanılan en yüksek hacimdeki taşıyıcıyı almalıdır. Test maddesi diyetle uygulanır ve gıda alımının azalmasına neden olursa, sonrasında bir çiftin beslendiği kontrol grubunun kullanılması test modelindeki toksikolojik değişikliklere bağlı azalmaların ayırt edilmesi açısından faydalı olabilir.

Taşıyıcı ve diğer katkı maddelerinin: absorpsiyon, dağılım, metabolizma veya test maddesinin alıkonması üzerine etkiler, test maddesinin toksik özelliğini değiştirebilecek olan kimyasal özellikleri üzerine etkiler veya gıda ve su tüketimi veya hayvanların beslenme durumu üzerine etkiler gibi karakteristik özellikleri göz önüne alınmalıdır.

1.4.3.4. Sınır testi

Bir test tek bir dozda, en az 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün'e eşdeğer, çalışma için tanımlanan yöntemler kullanılarak, hiçbir olumsuz etkinin gözlenmediği durum meydana geliyorsa ve yapısal olarak benzer maddelerle ilgili verilere dayanılarak toksisite beklenmiyorsa, o zaman üç doz kullanılarak yürütülen tam bir çalışmanın yapılmasına gerek duyulmayabilir. Sınır testi, insan maruz kalımının daha yüksek bir dozun kullanılması gerekliliğine işaret ettiği durumlar haricinde uygulanır.

1.5. Test yönteminin tanımlanması

1.5.1. Dozların uygulanması

Hayvanlar test maddesiyle 90 gün boyunca haftanın her günü muamele edilerek doza maruz bırakılırlar. Başka bir doz kürü, örneğin haftada beş gün, kullanılacaksa gerekçelendirilmelidir. Test maddesi sondayla uygulanması tek doz olarak, gavaj yöntemi kullanılarak ve uygun entübasyon kanülüyle yapılır. Tek seferde uygulanabilecek olan maksimum sıvı hacmi, test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Sulu çözeltiler için 2 ml/100g vücut ağırlığının kullanılması haricinde, hacim 1 ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir. Normalde daha yüksek konsantrasyonlarda şiddetli etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için konsantrasyonun tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla test hacmindeki değişkenler en aza indirilmelidir.

Diyet veya içme suyuyla uygulanan maddeler için, test maddesi içeriğinin, miktarlarının normal beslenme veya su dengesiyle etkileşmediğinin garanti edilmesi önemlidir. Test maddesi ya sabit diyet konsantrasyonu (ppm) ya da hayvanların vücut ağırlığı üzerinden kullanılabilen sabit doz olarak uygulandığında, kullanılan alternatif belirtilmelidir. Sondayla uygulanan maddeler için, doz her gün yakın zamanlarda verilmelidir ve hayvan vücut ağırlığına dayanarak sabit doz elde etmek için gerektiği şekilde ayarlanmalıdır. 90-günlük bir çalışma uzun süreli bir kronik toksisite çalışmasının hazırlık aşaması olarak kullanılıyorsa, her iki çalışmada da benzer diyetler kullanılmalıdır.

1.5.2. Gözlemler

Gözlem süresi en az 90 gün olmalıdır. İkincil gruptaki takip eden gözlemler için planlanan hayvanlar uygun bir süre daha herhangi bir muamele yapılmadan, kalıcı toksik etkiler veya toksik etkilerin düzelme durumu için gözlem altında tutulmalıdır. Genel klinik gözlemler, günde en az bir defa tercihen günün aynı zamanlarında ve doz uygulamasından sonraki beklenen etkilerin pik süreleri göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Hayvanların klinik koşulları kaydedilmelidir. Günde en az iki defa, genellikle çalışmanın başında ve sonunda, tüm hayvanlar hastalık ve ölüm belirtileri için incelenirler. İlk maruz kalımdan önce bir kere (karşılaştırılmalarına olanak sağlar) ve daha sonra da haftada en az bir defa, tüm hayvanlara detaylı klinik gözlemler yapılmalıdır. Bu gözlemler kafeslerin dışındaki standart bir ortamda tercihen her seferinde aynı zamanda yapılmalıdır. Gözlemler dikkatlice, tercihen test uygulama laboratuvarı tarafından açıkça anlatılan skorlama sistemleri kullanılarak kaydedilmelidir. Test koşullarındaki değişimlerin en az olması ve gözlemlerin tercihen gözlemciler tarafından yapıldığının garanti edilmesi için çaba gösterilmelidir. Not alınan belirtiler ciltteki, kürkteki, gözlerdeki, mukoz (sümüksü) membranlardaki değişiklikleri, salgılama başlaması, atılım ve otonomik aktiviteyi (lakrimasyon, piloereksiyon (çoklu kasılma), gözbebeği büyüklüğü, solunumla ilgili olağan dışı durumlar) içermeli ancak bunlarla sınırlı olmamalıdır.Yürüyüşteki değişiklik, duruş ve klonik veya tonik hareketlerin varlığı yanında dokunmaya cevap, stereotipler (kendi kendini temizleme, rutin olarak kendi etrafında dönme) veya tuhaf davranışı (örneğin kendini sakatlama, geriye doğru yürüme) ayrıca kaydedilmelidir (1).

Oftalmoskop (gözlerin incelenmesi için kullanılan sistem) ve eşdeğeri uygun bir alet kullanılarak yapılan oftalmolojik (göze bağlı) incelemeler test maddesine maruz kalımdan önce ve çalışma sonlandırılırken, tercihen tüm hayvanlara ancak en azından yüksek doz ve kontrol grubundakilere yapılmalıdır. Gözlerde değişikliğe rastlanırsa, tüm hayvanlar incelenmelidir.

Maruz kalma süresinin sonuna doğru ve her koşulda 11 haftadan erken olmayacak şekilde, farklı yaklaşımları uyarıcı duyusal reaktivite (1) (örneğin, işitsel, görsel ve propriyoseptif uyarı) (2), (3), (4), kavrama gücünün değerlendirilmesi (5) ve motor aktivite değerlendirmesi (6) yapılmalıdır. Yöntemlerle ilgili takip edilecek daha fazla ayrıntı ilgili kaynaklarda verilmiştir. Ancak kaynaklarda belirtilenler dışında da alternatif yöntemler kullanılabilir. Çalışmanın sonuna doğru yürütülen fonksiyonel gözlemler, diğer çalışmalardan elde edilmiş veriler varsa ve günlük klinik gözlemler herhangi bir fonksiyonel bir zarar ortaya çıkarmazlarsa, ihmal edilebilir.
İstisnai olarak, fonksiyonel gözlemler ayrıca aksi takdirde fonksiyonel test performansıyla anlamlı olarak etkileşecek boyutta toksisite belirtileri gösteren gruplar için de ihmal edilebilir.

1.5.2.1. Vücut ağırlığı ve gıda/su tüketimi

Bütün hayvanlar en az haftada bir kez tartılmalıdırlar. Gıda ve su tüketimiyle ilgili ölçümler en az haftada bir yapılmalıdır. Test maddesi içme suyuyla uygulanıyorsa, su tüketimi ayrıca en az haftada bir ölçülmelidir. Su tüketimi ayrıca içme aktivitesinin değiştiği beslenme veya sonda ile besleme çalışmalarında da göz önünde bulundurulmalıdır.

1.5.2.2. Hematoloji ve klinik biyokimya

Uygulanabiliyorsa kan örnekleri, uygun koşullar altında adı belirtilen bölgeden alınmalı ve saklanmalıdır. Test süresinin sonunda kan örnekleri hayvanların öldürülmelerinden hemen önce ya da öldürme işleminin bir parçası olarak alınırlar. Test süresinin sonunda ve ara kan örnekleri alındıktan sonra: Hematokrit, hemoglobin derişimi, eritrosit sayımı, toplam ve türevsel lökosit sayısını ve pıhtılaşma süresi, platelet sayımı ve pıhtılaşma zaman/potansiyel ölçümü gibi hematolojik incelemeler yapılmalıdır.

Dokulardaki, özellikle de böbrek ve karaciğerdeki, temel toksik etkileri araştırmak için her bir hayvandan öldürülmelerinden hemen önce ya da öldürme işleminin bir parçası olarak (ölmek üzere bulunanlar ve/veya çalışma arasında öldürülenlerden başka) alınan kan örneklerinde klinik biyokimya tayinleri yapılmalıdır. Hematolojik incelemelere benzer şekilde, biyokimyasal testler için ara örnekler alınması söz konusu olabilir. Hayvanlardan kan numunesi alınmadan önceki gece aç bırakılmaları tavsiye edilir[1]. Plazma ve serumdaki incelemelere sodyum, potasyum, glikoz, toplam kolesterol, üre, kan üre azotu, kreatin, toplam protein ve albumin ve hepatoselüler etkilerin göstergesi olan ikiden fazla enzim (alenin amino transferaz, aspartat amino transferaz, alkalin fosfataz, gama glutamil transpeptidaz ve sorbitol dehidrogenaz gibi) dahildir. İlave enzimler (hepatik veya diğer kaynaklı) ve safra asiti bazı durumlarda faydalı bilgi sağladıklarından dolayı ayrıca incelenebilir.

İsteğe bağlı olarak, görüntü, hacim, osmolite veya özgül ağırlık, pH, protein, glikoz ve kan/kan hücreleri üriner analiz belirlemeleri çalışmanın son haftasında zamana bağlı idrar hacmi toplamı kullanılarak yapılabilir. İlaveten, genel doku hasarlarının serum göstergelerini araştırmak için de çalışmalar yapılmalıdır. Maddenin bilinen özellikleri kalsiyum, fosfor, açlık trigliseritleri, özel hormonlar, methemoglobin ve kolinesteraz gibi ilgili metabolik profilleri etkileyebiliyorsa ya da böyle bir şüphe varsa diğer belirlemeler yapılmalıdır. Bunların belli sınıftaki kimyasallar için veya duruma göre yapılması gerekir.

Sonuç olarak, türlere ve verilen bir maddenin gözlenen ve/veya beklenen etkisine bağlı olarak esnek bir yaklaşıma ihtiyaç vardır.

Geçmişe dayalı taban çizgisi verileri yetersizse, doz uygulamasına başlamadan önce hematolojik ve klinik biyokimya değişkenlerinin belirlenip belirlenmemesi düşünülmelidir, genellikle bu verilerin muameleye başlamadan önce oluşturulması tavsiye edilmez (7)

1.5.2.3. Tam teşekküllü otopsi

Çalışmadaki bütün hayvanlara tam teşekküllü otopsi yapılmalıdır. Buna, vücudun dış yüzeyindeki tüm ofirislerin ve kafatasının, göğüs ve karın boşluklarının ve bunların içeriklerinin incelenmesi dâhildir.

Tüm hayvanların karaciğer, böbrekler, adrenaller, testis, epididimis, mesane, yumurtalıklar, timus, dalak, beyin ve kalbi (ölmek üzere bulunanlar ve/veya çalışma arasında

[1] Serum ve plazmadaki bir dizi ölçüm özellikle de glikoz için, hayvanların bir gece aç bırakılması tercih edilecektir. Bu tercih için asıl neden açlık olmaması durumunda değerin artmasıdır, bu artış da derideki etkileri maskeleyecek ve yorum yapılmasını zorlaştıracaktır. Diğer taraftan, gece boyunca aç bırakılma hayvanların genel metabolizmasını etkileyebilir ve özellikle de beslenmeyle ilgili çalışmalarda, test maddesinin günlük alımını aksatabilir. Eğer gece boyunca aç bırakma benimsenirse, klinik biyokimyasal belirlemeler çalışmadaki fonksiyonel gözlemler yürütüldükten sonra yapılmalıdır.

öldürülenlerden başka) yapışık dokulardan ayrılmalı, parçalara ayrıldıktan sonra kurumasından olabildiğince kaçınılarak ıslak ağırlıkları tartılmalıdır.

Aşağıdaki dokular her iki doku tipi için de uygun sabitleyici ortamda muhafaza edilmelidir. Sonrasında bütün büyük lezyonların, beyin (tipik bölgeler- medulla/pons, serebrum, serebellum), spinal cord (omurilik) (üç düzeyde - servikal, mid-torasik ve lumbar), hipofiz, tiroit/paratiroit, timus, özafagus, tükrük salgıları, mide, ince ve kalın bağırsak (Peyer plakları dahildir), karaciğer, pankreas, böbrekler, adrenal, dalak, kalp, trake, akciğerler aort, gonadlar, uterus, yardımcı cinsiyet organları, dişi meme bezi, prostat, idrar torbası, safra kesesi, lenf nodülleri (tercihen bir lenf nodülü uygulama yolunu kapsar, diğeri ise uygulama yolundan uzakta, sistemik etkileri kapsar), periferal sinir (siyatik veya tibiyal) tercihen kasa oldukça yakın kemik iliği kesiti (ve/veya taze kemik iliği aspiratı), deri ve gözler (oftalmolojik inceleme sırasında değişiklik gözlenirse) histopatolojik incelemelerinin yapılması istenir. Klinik ve diğer bulgular başka dokuların da incelenmesi gerektiğini önerebilir. Ayrıca, test maddesinin bilinen özelliklerine dayanılarak hedef organ olabileceği düşünülen herhangi bir organ muhafaza edilmelidir.

1.5.2.4. Histopatoloji

Yüksek doz grubunun ve kontrol grubunun muhafaza edilen organ ve dokularında tüm histopatolojik incelemeler yapılmalıdır. Yüksek doz grubunda muameleye bağlı değişiklikler gözlenirse, bu incelemeler diğer dozlama gruplarına ait hayvanlarda da yapılmalıdır. Bütün büyük lezyonlar incelenmelidir. İkincil izleme grubu kullanılıyorsa, muamele edilen gruplarda etki gözlendiği belirlenen organların histopatolojik incelemeleri yapılmalıdır.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Veriler

Her bir veri ayrı ayrı sağlanmalıdır. İlaveten bütün veriler her test grubu için testin başındaki hayvan sayısını, test sırasında ölen veya insani gerekçelerle öldürülen hayvan sayısını, toksisite belirtisi gösteren hayvan sayısını, gözlenen toksisite belirtilerinin tanımlarını- başlama zamanı,, süreklilik ve herhangi bir toksik etki için önem içermeli- lezyonları olan hayvan sayısını, lezyonların türünü ve herbir lezyon için hayvan yüzdesini gösteren çizelge halinde özetlenmelidir.

Uygulanabilir olduğunda sayısal sonuçlar uygun ve genellikle kabul görmüş istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmelidirler.
İstatistiksel yöntemler ve analiz edilecek veriler çalışmanın tasarlanması sırasında seçilmelidir.

2.2. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

2.2.1. Test maddesi:
- fiziksel yapısı, safsızlık ve fizikokimyasal özellikleri;
- tanım verileri;

- taşıyıcı (eğer uygunsa): sudan farklıysa, taşıyıcı seçimi için gerekçe.

2.2.2. Test türleri:
- kullanılan tür ve ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, diyet vs.;
- testin başında her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı,

2.2.3. Test koşulları:
- doz seçimi için gerekçe;
- test maddesinin formülasyonu/diyet hazırlanması, ulaşılan derişim, hazırlanan karışımın kararlılığı ve homojenliğiyle ilgili detaylar;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- mevcut dozun (mg/kg vücut ağırlığı/gün), eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi derişiminin (ppm) mevcut doza çevrilmesi;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar;

2.2.4. Sonuçlar:
- vücut ağırlığı ve vücut ağırlığı değişimleri;
- uygulanabiliyorsa, gıda ve su tüketimi
- Cinsiyete ve doza göre toksik cevap verileri (toksisitenin oluşturduğu etkilerini içeren);
- klinik gözlemlerin doğası, şiddeti ve süresi (tersinir olup olmadığı);
- oftalmolojik inceleme sonuçları;
- duyusal aktivite, kavrama kabiliyeti ve motor aktivite değerlendirmeleri (uygun olduğunda);
- uygun taban değerleri ile birlikte hematolojik testler;
- uygun taban değerleri ilebirlikte klinik biyokimya testleri;
- son vücut ağırlığı, organ ağırlıkları ve organ/vücut ağırlığı oranları;
- otopsi bulguları;
- tüm histopatolojik bulguların detaylı tanımları;
- absorbsiyon verileri, eğer mevcutsa;
- uygun yerlerde sonuçların istatistiksel uygulamaları

Sonuçların tartışılması

Yorumlar

3. KAYNAKLAR

(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, 999-1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol.
Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 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, 198-201.

B.27. SUB-KRONİK ORAL TOKSİSİTE TESTİ KEMİRGENLER DIŞINDA 90 – GÜN TEKRARLI DOZ ORAL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

Bu sub-kronik oral toksisite test yöntemi OECD TG 409 (1998)'e eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Kimyasalın toksik özelliklerinin değerlendirilmesinde, tekrarlı dozlar verilerek sub-kronik oral toksisite belirlenmesi, akut veya 28-gün tekrarlı doz toksisite testlerinden kimyasalın toksisitesi hakkında başlangıç bilgisi elde edildikten sonra yapılmalıdır. 90 günlük çalışma sütten kesilme sonrası olgunlaşmayı ve erişkinliğe geçişi içine alan uzamış bir zaman aralığının da üstünde tekrarlı maruz kalmadan kaynaklanabilecek olası sağlık tehlikeleriyle ilgili bilgi sağlar. Çalışma başlıca toksik etkileri hakkında bilgi sağlayacak, hedef organlara ve birikim olasılığına işaret eder ve kronik çalışmalar için doz seviyelerinin belirlenmesinde ve insan maruz kalmasında güvenlik kriterlerinin oluşturulmasında kullanılan hiçbir olumsuz etkinin gözlenmediği dozun tahmin edilmesini sağlar.

Bu yöntem, kimyasal maruz kalmasının kemirgen olmayan türlerdeki olumsuz etkilerinin belirlenmesine olanak sağlar ve sadece,

–diğer çalışmalarda gözlenen etkilerin, kemirgen olmayan ikinci bir türde netleştirilmesi/tanımlanması gerektiğine işaret ettiği durumlarda, veya

– toksikokinetik çalışmalarının kemirgen haricinde özgün bir türün en uygun laboratuvar hayvanı olduğunu gösterdiği durumlarda veya

–kemirgen olmayan türlerin kullanılmasını tanımlayan diğer özel nedenlerin olduğu durumlarda,

kullanılmalıdır.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar

Doz: Uygulanan test maddesinin miktarıdır. Doz, ağırlık (g, mg) veya test hayvanının birim ağırlığı başına düşen test maddesi ağırlığı (örneğin, mg/kg) veya sabit diyet derişimi olarak (ppm) ifade edilir.

Dozaj: doz, doz frekansı ve doz uygulanma süresini içine alan genel ifadedir.

NOAEL: Olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviye.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi deney hayvanlarının muhtelif gruplarına oral yolla kademeli dozlarla, grup başına bir doz olacak şekilde, 90 gün boyunca uygulanır. Uygulama süresi boyunca hayvanlar toksisite belirtileri için yakından gözlenirler. Test sırasında ölen ya da öldürülen hayvanlara otopsi yapılır, ayrıca testin sonunda sağ kalan hayvanlar da öldürülerek onlara da otopsi yapılır.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hayvan türlerinin seçimi

Yaygın olarak kullanılan, tanımlı bir cinse ait olanve kemirgen olmayan tür köpektir, tazıda sıkça kullanılır. Diğer türler, örneğin, domuz ailesi, küçük domuz türleri ayrıca kullanılabilir. Primatlar tavsiye edilmez ve kullanımları gerekçelendirilmelidir. Genç, sağlıklı hayvanlar kullanılmalıdır ve köpek kullanılan durumlarda doz uygulamaları tercihen hayvan 4-6 aylıkken ve 9 aylığı geçmeden yapılmalıdır. Çalışmanın daha uzun süreli kronik bir çalışmanın ön çalışması olduğu durumlarda her iki çalışmada da aynı tür/cins kullanılmalıdır.

1.4.2. Hayvanların hazırlanması

Laboratuvar koşullarına en az 5 gün uyum sağlamış ve daha önceden deneysel işlemlere maruz kalmamış sağlıklı hayvanlar kullanılmalıdır. Uyum süresi seçilen test hayvanlarının tür ve kaynağına bağlıdır. Köpekler veya yerleşik bir koloniden domuz yavrularının çoğaltılması amacıyla, en az 5 gün ve yine bu hayvanlar için eğer dış kaynaklar söz konusuysa iki hafta tavsiye edilmektedir. Test hayvanları tür, ırk, kaynak, cinsiyet, ağırlık ve/veya yaşlarına göre tanımlanmalıdır. Hayvanlar rastgele kontrol ve uygulama gruplarına ayrılırlar. Kafesler, yerleştirilmelerinden meydana gelebilecek olası etkiler en aza indirilecek şekilde ayarlanmalıdır. Her hayvana kendisine özgü bir kimlik numarası verilir.

1.4.3. Dozların hazırlanması

Test maddesi sonda ile besin, içme suyu veya kapsülle uygulanabilir. Oral yolla uygulama yötemi, bu çalışmanın amacına ve test maddesinin fiziksel/klimyasal özelliklerine bağlıdır. Gerekli yerlerde test maddesi uygun bir taşıyıcı içinde çözünebilir veya askıda kalabilir. Gerekli olduğunda test maddesi çözülür veya uygun bir taşıyıcıda askıda kalır. Uygun olan her yerde öncelikle sulu çözelti/süspansiyon kullanımı tavsiye edilir, bunu yağda (ör.mısır yağı) çözelti/emülsiyon (dağılma şeklinde) kullanımı ve diğer taşıyıcılardaki olası çözelti kullanımı izler. Su dışındaki taşıyıcıların toksik özellikleri bilinmelidir. Test maddesinin uygulama koşullarındaki kararlılığı belirlenmelidir.

1.5. İşlem

1.5.1. Hayvanların sayı ve cinsiyeti

Her bir doz için en az 8 hayvan (dört dişi ve dört erkek) kullanılmalıdır. Arada yaşamlarını sonlandırma planlanmıyorsa, çalışma tamamlanmadan önce sağ kalımı planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır. Çalışmanın sonundaki hayvan sayısı toksik etkilerin anlamlı bir değerlendirilmesinin yapılabilmesi için uygun sayıda olmalıdır. Bir kimyasal ya da yakın bir benzeri ile ilgili daha önceki bilgilere dayanılarak, muamele süresi sonrasında toksik etkilerin

tersinirlikleri veya kalıcılıklarının gözlenebilmesi için kontrol ve en yüksek doz grubu için 8 (cinsiyet başına dört) hayvandan oluşan ilave bir uydu grubun yer alması üzerinde düşünülmelidir. Muamele sonrasındaki bu sürenin uzunluğu gözlenen etkilere bağlı olarak uygun şekilde sabitlenmelidir.

1.5.2. Dozaj

Sınır testinin yürütüldüğü durumlar haricinde (bakınız 1.5.3), en az üç doz ve eş zamanlı kontrol kullanılır. Doz seviyeleri tekrarlı doz veya aralık bulma çalışmalarının sonuçlarına dayanabilir. Test bileşiğinin veya ilgili materyallerin metabolizması veya toksikokinetiğiyle ilgili ilave bilgiler de dikkate alınmalıdır. Test maddesinin fizikokimyasal doğası veya biyolojik etkileri tarafından sınırlanmadıkça, seçilecek en yüksek doz toksisiteyi uyarmalı fakat ölüm ve şiddetli rahatsızlıkları uyarmamalıdır. Doz seviyelerinin azalan dizisi dozaja bağlı cevabı veya olumsuz etkinin gözlemlenmediği en düşük düzeyi (NOAEL) gösterecek şekilde seçilmelidir. İki –dört katlı aralıklar azalan doz seviyeleri için genelde en uygun olanıdır. Dördüncü bir test grubunun ilave edilmesi doz grupları arasında geniş aralıklar kullanılmasına (ör. 6-10 kattan daha fazla) genellikle tercih edilir. Kontrol grubu, muamele edilmemiş bir kontrol grubu olmalı veya test maddesi uygulanırken taşıyıcı kullanılmışsa taşıyıcı-kontrol grubu olmalıdır. Test maddesiyle muamele edilenler hariç, kontrol grubundaki hayvanlar test grubundakilerle benzer şekilde muamele edilmelidir. Eğer taşıyıcı kullanılmışsa, kontrol grupları taşıyıcıyı kullanılan en yüksek miktarda alır. Eğer test maddesi diyetle uygulanır ve gıda alımının azalmasına neden olursa, o zaman çift-besleme kontrol grubunun kullanılması test modelindeki toksikolojik değişikliklere bağlı azalmaların ayırt edilmesi için faydalı olabilir.

Taşıyıcı ve diğer katkı maddelerinin absorpsiyon, dağılım, metabolizma veya test maddesinin alıkonması üzerindeki etkiler, test maddesinin zehirli özelliğini değiştirebilecek olan kimyasal özellikleri üzerine etkiler veya gıda ve su tüketimi veya hayvanların beslenme durumu üzerine etkiler gibi özelliklerinin üzerinde durulmalıdır.

1.5.3. Sınır testi

Bir test tek bir dozda, en az 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün'e eşdeğer, çalışma için tanımlanan yöntemler kullanılarak, hiçbir olumsuz etkinin gözlenmediği durum meydana geliyorsa ve yapısal olarak benzer maddelerle ilgili verilere dayanılarak toksisite beklenmiyorsa, o zaman üç doz kullanılarak yürütülen tam bir çalışmanın yapılmasına gerek duyulmayabilir. Sınır testi, insan maruz kalımının daha yüksek bir dozun kullanılması gerekliliğine işaret ettiği durumlar haricinde uygulanır.

1.5.4. Dozların uygulanması

Hayvanlar test maddesiyle 90 gün boyunca haftanın her günü muamele edilerek doza maruz bırakılırlar. Başka bir doz kürü, örneğin haftada beş gün, kullanılacaksa tanımlanmaya ihtiyaç duyulur. Test maddesinin sonda ile uygulandığında tek doz halinde, gavaj yöntemi kullanılarak veya uygun entübasyon kanülüyle (bir elastik boru enjeksiyonu) kullanılarak yapılmalıdır. Tek seferde uygulanabilen maksimum sıvı hacmi, test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır.Hacim olabildiğince küçük tutulmalıdır. Normalde daha yüksek derişimlerde daha kötü etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için derişimin tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla test hacmindeki değişkenlilik en aza indirilmelidir.

Diyet veya içme suyuyla uygulanan maddeler için, test maddesi içeriğinin hiçbir miktarlarının normal beslenme veya su dengesiyle etkileşmediğinden emin olmak gerekir.. Test maddesi ya sabit diyet konsantrasyonu (ppm) ya da hayvanların vücut ağırlığı üzerinden kullanılabilen sabit doz olarak uygulandığında, kullanılan alternatif belirtilmelidir. Sonda ile uygulanan maddeler için, doz her gün yakın saatlerde verilmelidir ve hayvan vücut ağırlığına dayanarak sabit doz elde etmek için gerektiği şekilde ayarlanmalıdır. 90-günlük bir çalışma uzun süreli bir kronik toksisite çalışmasının hazırlık aşaması olarak kullanılıyorsa, her iki çalışmada da benzer diyetler kullanılmalıdır.

1.5.5. Gözlemler

Gözlem süresi en az 90 gün olmalıdır. İkincil gruptaki takip eden gözlemler için planlanan hayvanlar uygun bir süre daha herhangi bir muamele yapılmadan, kalıcı toksik etkiler veya toksik etkilerin düzelme durumu için gözlem altında tutulmalıdır. Genel klinik gözlemler, günde en az bir defa tercihen günün aynı saatlerinde ve doz uygulamasından sonraki beklenen etkilerin pik süreleri göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Hayvanların klinik koşulları kaydedilmelidir. Günde en az iki defa, genellikle çalışmanın başında ve sonunda, tüm hayvanlar hastalık ve ölüm belirtileri açısından incelenirler. İlk maruz kalmadan önce bir defa (karşılaştırılmalarına olanak sağlar) ve daha sonra da haftada en az bir defa, tüm hayvanlara detaylı klinik gözlemler yapılmalıdır. Bu gözlemler kafeslerin dışındaki standart bir ortamda tercihen her seferinde aynı saatlerde yapılmalıdır. Gözlemler dikkatlice, test uygulama laboratuvarı tarafından açıkça anlatılan skorlama sistemleri kullanılarak kaydedilmelidir. Test koşullarındaki değişimlerin en az olması ve gözlemlerin gözlemciler tarafından yapıldığının teyid edilmesi için çaba gösterilmelidir. Not alınan belirtiler ciltteki, kürkteki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki değişiklikleri, salgılama başlaması, atılım ve otonomik aktiviteyi (lakrimasyon, piloereksiyon, gözbebeği büyüklüğü, solunumla ilgili olağan dışı durumlar) içermeli ancak bunlarla sınırlı olmamalıdır.Yürüyüşteki değişiklik, duruş ve klonik veya tonik hareketlerin varlığı yanında dokunmaya cevap, stereotipler (aşırı tımarlanma, rutin olarak kendi etrafında dönme) veya tuhaf davranışı (örneğin: kendini sakatlama, geriye doğru yürüme) ayrıca kaydedilmelidir (1).

Oftalmoskop(göz kontrolü için kullanılan cihaz) ve eşdeğeri uygun bir alet kullanılarak yapılan oftalmolojik (göz muayenesine dayanan) incelemeler test maddesine maruz kalmadan önce ve çalışma sonlandırılırken, tercihen tüm hayvanlara en azından yüksek doz ve kontrol grubundakilere yapılmalıdır. Gözlerde değişikliğe rastlanırsa, tüm hayvanlar incelenmelidir.

1.5.5.1. Vücut ağırlığı ve gıda/su tüketimi

Bütün hayvanlar en az bir hafta önce tartılmalıdırlar. Gıda ve su tüketimiyle ilgili ölçümler en az haftada bir yapılmalıdır. Test maddesi içme suyuyla uygulanıyorsa, su tüketimi ayrıca en az haftada bir yapılmalıdır. Su tüketimi ayrıca içme aktivitesinin değiştiği beslenme veya gavaj çalışmalarında da göz önünde bulundurulmalıdır.

1.5.5.2. Hematoloji ve Klinik biyokimya

Uygulanabiliyorsa kan örnekleri, uygun koşullar altında adı belirtilen bölgeden alınmalı ve saklanmalıdır. Test süresinin sonunda kan örnekleri hayvanların öldürülmelerinden hemen önce ya da öldürme işleminin bir parçası olarak alınırlar. Hematokrit, hemoglobin derişimi, eritrosit sayımı, toplam ve türevsel (farklılaşmış) lökosit sayımını içeren hematolojik

incelemeler ve protrombin süresi veya tromboplastin süresi gibi bir pıhtılaşma potansiyeli ölçümü çalışmanın başında araştırılmalıdır, daha sonra test süresi boyunca aylık aralıklarla ya da testin ortasında, ve sonuç olarak test süresinin sonunda yapılmalıdır.

Dokulardaki, özellikle de böbrek ve karaciğerdeki, temel toksik etkileri araştırmak için test süresi boyunca testin başında, sonra aylık aralıklarla veya testin ortasında ve sonuç olarak testin sonunda alınan kan örneklerinde klinik biyokimya tayinleri yapılmalıdır. Üzerinde durulacak test alanları, elektrolit dengesi, karbonhidrat metabolizması ve karaciğer ve böbrek fonksiyonlarıdır. Özel testlerin seçimi test maddesinin etki şekliyle ilgili gözlem sonuçlarından etkilenir.
Hayvanlar kan örnekleri alınmadan önce türe uygun bir süre için aç bırakılmalıdırlar. Önerilen tayinler kalsiyum, fosfor, klorür, açlık şekeri, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, ornitin, dekarboksilaz, gama glutamil transpeptidaz, üre, azot, albümin, kan kreatini, toplam bilirubin ve toplam serum proteini ölçümlerini içermektedir.

Üriner analiz belirlemeleri çalışmanın en azından başında, sonra ortasında ve nihayet sonunda zamana bağlı idrar hacmi toplamı kullanılarak yapılmalıdır. Üriner analiz tayinleri, görüntü, osmolite veya özgül ağırlık, pH, protein, glikoz ve kan/kan hücreleri tayinlerini içerir. İlave olarak, gözlenen etkilerin araştırılmasını genişletmek için gerekliyse ek parametreler de çalışılabilir. Genel doku hasarlarının serum göstergelerini araştırmak için de çalışmalar yapılmalıdır. Toksikolojik değerlendirme için gerekli olan diğer tayinler lipitler, hormonlar, asit/baz dengesi, metahemoglobin ve kolinesteraz inhibisyonunu içermektedir. Gözlenen etkilerin araştırılmasını genişletmek için gerekliyse ek klinik biyokimya incelemeleri yapılabilir. Bunlar, belli sınıftaki kimyasalların duruma göre tanımlanmasına ihtiyaç duyarlar. Sonuç olarak, türlere ve verilen bir maddenin gözlenen ve/veya beklenen etkisine bağlı olarak esnek bir yaklaşıma ihtiyaç vardır.

1.5.5.3. Tam teşekküllü otopsi

Çalışmadaki bütün hayvanlara tam teşekküllü otopsi yapılmalıdır. Buna, vücudun dış yüzeyindeki tüm orifislerin, kafatası, göğüs ve karın boşluklarının ve bunların içeriklerinin incelenmesi dâhildir. Tüm hayvanların karaciğer ve safra kesesi, böbrekler, adrenaller, testis, epididimis, yumurtalıklar, mesane, tiroit (paratiroitle birlikte), timus, dalak, beyin ve kalbi (ölmek üzere bulunanlar ve/veya çalışma esnasında öldürülenlerden başka) yapışık dokulardan ayrılmalı, parçalara ayrıldıktan sonra kurumasından olabildiğince kaçınılarak ıslak ağırlıkları tartılmalıdır.

Aşağıdaki dokular her iki doku tipi için de uygun sabitleyici ortamda muhafaza edilmelidir. Sonrasında bütün büyük lezyonların, beyin (tipik bölgeler- medulla/pons, serebrum, serebellum), omurilik (üç düzeyde – boyna ait(servikal) orta göğüs(mid-torasik) ve lumbar), hipofiz, tiroit/paratiroit, timus, özofagus, tükrük salgıları, mide, ince ve kalın bağırsak (Peyer plakları dâhildir), karaciğer, pankreas, böbrekler, böbreküstü bezi, dalak, kalp, soluk borusu, akciğerler aort, yumurtalıklar, mesane, yardımcı cinsiyet organları, dişi meme bezi, prostat, idrar torbası, safra kesesi, lenf nodülleri (tercihen bir lenf nodülü uygulama planını kapsar, diğeri ise uygulama yolundan uzakta, sistemik etkileri kapsar), periferal sinir (siyatik veya tibiyal) tercihen kasa oldukça yakın kemik iliği kesiti (ve/veya taze kemik iliği aspiratı) ve deri. Histopatolojik incelemelerinin yapılması istenir. Klinik ve diğer bulgular başka dokuların da incelenmesi gerektiğini önerebilir. Ayrıca, test maddesinin bilinen özelliklerine dayanılarak hedef organ olabileceği düşünülen herhangi bir organ muhafaza edilmelidir.

1.5.5.4. Histopatoloji

Yüksek doz grubunun ve kontrol grubunun muhafaza edilen organ ve dokularda histopatolojik incelemeler yapılmalıdır. Yüksek doz grubunda muameleye bağlı değişiklikler gözlenirse, bu incelemeler diğer dozaj gruplarına ait hayvanlara da yapılmalıdır. Bütün büyük lezyonlar incelenmelidir. İkincil izleme grubu kullanılıyorsa, muamele edilen gruplarda etki gözlendiği belirlenen organların histopatolojik incelemeleri yapılmalıdır.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Veriler

Her bir veri ayrı ayrı sağlanmalıdır. Bütün veriler her test grubu için testin başındaki hayvan sayısını, test sırasında ölen veya insani gerekçelerle öldürülen hayvan sayısını, toksisite belirtisi gösteren hayvan sayısını, gözlenen toksisite belirtilerinin tanımlarını- yaraları olan hayvan sayısını, yaraların türünü ve herbir yara için hayvan yüzdesini gösteren çizelge halinde özetlenmelidir.

Mümkünse sayısal sonuçlar uygun ve genellikle kabul görmüş istatiksel yöntemlerle değerlendirilmelidirler. İstatistiksel yöntemler ve analiz edilecek veriler çalışmanın tasarlanması sırasında seçilmelidir.

2.2. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

2.2.1. Test maddesi:
- fiziksel tabiatı, safsızlık ve fizikokimyasal özellikleri;
- tanım verileri;
- taşıyıcı (eğer uygunsa): sudan farklıysa, taşıyıcı seçimi için gerekçe.

2.2.2. Test türleri:
- kullanılan türler ve ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, diyet vs.;
- testin başında her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı,

2.2.3. Test koşulları:
- doz seçimi için gerekçe;
- test maddesinin formülasyonu/diyet hazırlanması, ulaşılan derişim, hazırlanan karışımın kararlılığı ve homojenliğiyle ilgili detaylar;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- mevcut dozun (mg/kg vücut ağırlığı/gün), eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi derişiminin (ppm) mevcut doza çevrilmesi;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar

2.2.4. Sonuçlar:

- vücut ağırlığı ve vücut ağırlığı değişimleri;
- uygulanabiliyorsa, gıda ve su tüketimi
- cinsiyete ve doza göre toksik - cevap verileri (toksisitenin oluşturduğu etkileri içeren);
- klinik gözlemlerin doğası, şiddeti ve süresi (tersinir olup olmadığı);
- oftalmolojik inceleme sonuçları;
- duyusal etkinlik, kavrama kabiliyeti ve motor etkinliği değerlendirmeleri (uygun olduğunda);
- olması gereken değerlerle birlikte hematolojik testler;
- olması gereken değerlerle birlikte klinik biyokimya testleri;
- son vücut ağırlığı, organ ağırlıkları ve organ/vücut ağırlığı oranları;
- otopsi bulguları;
- tüm histopatolojik bulguların detaylı tanımları;
- absorbsiyon ve metabolizma verileri, eğer mevcutsa;
- uygun yerlerde sonuçların istatistiksel uygulamaları.

Sonuçların tartışılması.

Yorum.

B. 28 SUB -KRONİK DERMAL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI KEMİRGEN TÜRLER KULLANILARAK 90-GÜN TEKRARLI DERMAL DOZ ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi, her gün çeşitli gruplardaki deney hayvanlarının derilerine grup başına bir doz değeri kullanılarak kademeli dozlarda 90 gün boyunca uygulanır. Uygulama süresince hayvanlar toksisite belirtilerine karşı her gün gözlemlenir. Test sırasında ölen hayvanlarla deney sonunda hayatta kalan deney hayvanlarına nekropsi yapılır.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Test hayvanları testten en az beş gün öncesinden deneysel barınma ve beslenme koşullarında tutulurlar. Test öncesinde sağlıklı genç hayvanlar rastgele kontrol ve uygulama gruplarına ayrılırlar. Teste başlamadan kısa bir süre öncesinde kürk kırpılarak test hayvanının gövdesinin sırt bölgesinden uzaklaştırılmalıdır. Traş işlemi testten yaklaşık 24 saat önce uygulanmalıdır. Haftalık aralıklarla tüylerin traş edilmesinin veya kırpılmasının tekrar edilmesi gerekebilir. Kürk kırpılırken veya traş edilirken, deriye zarar vermekten kaçınılmalıdır. Vücut yüzeyinin % 10'undan az olmayacak bir alanı test maddesinin uygulanması için temiz olmalıdır.

Temizlenmesi gereken alana ve kaplanması gereken boyutlara karar verilirken hayvanın ağırlığı dikkate alınmalıdır. Uygunsa toz haline getirilebilen katı maddeler test edilirken, test maddesinin cilde iyi temas etmesi için yeterli miktarda suyla veya gerekli durumlarda uygun bir taşıyıcıyla ıslatılmalıdır. Sıvı haldeki test maddeleri seyreltilmemiş halde kullanılmalıdır. Haftada beş-yedi günlük temele dayanan uygulama yapılır.

Test koşulları

Deney hayvanları

Yetişkin sıçan, tavşan veya kobay domuz kullanılabilir. Diğer türler de kullanılabılır ancak kullanımları gerekçelendirilmelidir. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişimi, uygun ortalama ağırlık değerinin % 20'sini geçmemelidir. Sub-kronik dermal çalışma uzun süreli bir çalışmanın ön çalışması olarak yürütülüyorsa, her iki çalışmada da aynı tür ve suşlar kullanılmalıdır.

Sayı ve cinsiyet

Her bir doz için sağlıklı bir cilde sahip en az 20 hayvan (10 dişi ve 10 erkek) kullanılmalıdır. Dişilerin, doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Aralarda da hayvan öldürülmesi planlanıyorsa çalışma tamamlanmadan öldürülmesi planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır. Ayrıca, 20 hayvandan oluşan bir ikincil izleme grubu (cinsiyet başına 10 hayvan) 90 gün boyunca yüksek doz düzeyine maruz bırakılabilirler ve uygulama sonrasındaki 28 gün içinde toksik etkilerin tersinirliği, kalıcılıkları veya gecikmiş oluşumu açısından gözlemlenmelidirler.

Doz seviyeleri

Kontrol veya taşıyıcı kullanılmışsa taşıyıcı için kontrolle birlikte en az üç doz gereklidir. Maruz kalma süresi günlük en az altı saat olmalıdır. Test maddesinin uygulanması günlük benzer zamanlarda yapılmalıdır ve hayvan vücut ağırlığına dayanarak sabit doz seviyeleri elde etmek için uygulanan maddenin miktarı aralıklarla (haftada ya da iki haftada bir) ayarlanmalıdır. Test maddesiyle muamele edilenler dışında, kontrol grubundaki hayvanlar test grubundakilerle benzer şekilde tutulmalıdırlar. Dozun uygulanmasını kolaylaştırmak için taşıyıcı kullanılan durumlarda, taşıyıcı kontrol grubu da uygulama grubuyla benzer şekilde uygulanmalıdır ve en yüksek doz grubunun aldığı miktarı aynı miktarda almalıdır. En yüksek dozda toksik etki görülmeli ancak çok az ölüm olmalı ya da hiç olmamalıdır.

En düşük doz herhangi bir toksisite meydana getirmemelidir. İnsan maruz kalımına dair kullanılabilir bir tahmininin olduğu durumlarda, en düşük değer bunu geçmemelidir. İdeal olarak, ara doz düzeyi en az gözlenebilir toksik etki meydana getirmelidir. Birden fazla ara doz kullanılmışsa, doz seviyeleri kademeli olarak toksik etki oluşturacak şekilde yerleştirilmelidir. Kontrollerdeki düşük ve ara gruplarda sonuçların anlamlı olarak değerlendirilmesi için ölüm oluş sıklığının düşük olması gerekir.

Test maddesi uygulaması ciltte tahriş oluşturuyorsa, derişimler düşürülmeli ve bu durum yüksek dozda görülen toksik etkilerin azalması veya yok olmasıyla sonuçlanabilir. Cilt oldukça kötü şekilde zarar görmüşse, çalışmaya son verilmesi gerekir ve daha düşük derişimlerde yeni bir çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulabilir.

Sınır testi

1000 mg/kg dozlu veya olası insan maruz kalımıyla ilgili daha yüksek dozlu bir ön çalışmada hiçbir toksik etki gözlenmiyorsa, ilave testlerin üzerinde düşünülmesine gerek yoktur

Gözlem süresi

Deney hayvanları toksisite belirtileri için günlük olarak gözlenmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlar ve ölüm zamanları kaydedilmelidir.

İşlem

Hayvanlar ayrı ayrı kafeslere konmalıdırlar. Hayvanlar test maddesiyle haftada yedi gün, 90 gün boyunca muamele edilirler. Herhangi bir ikincil izleme grubunda devam eden gözlemler için programlanan hayvanlar ilave bir 28 gün daha muamele edilmeden tutulmalı, toksik etkileri düzelip düzelmediği belirlenmelidir. Maruz kalma süresi günde en az altı saat olmalıdır.

Test maddesi, toplam vücut yüzey alanının %10'u bir alan üzerine tek tip uygulanır. Oldukça toksik maddelerle kaplanan yüzey alanı daha az olabilir fakat mümkün olduğunda geniş bir alan ince ve tektip bir katman halinde kaplanmalıdır.

Maruz kalma süresince, test maddesi tahriş etmeyen bir gözenekli gazlı bezle cilde temas ettirilmelidir. Test yapılacak taraf gazlı bezi muhafaza etmek için uygun bir şekilde sarılmalıdır ve hayvanların test maddesini yememeleri sağlanmalıdır. Test maddesinin yenmesini engellemek için tasma gibi engelleyici düzenek kullanılabilir ancak hayvanların tamamen hareketsiz olmaları tavsiye edilen bir yöntem değildir. Maruz kalma süresinin sonunda, yapılabiliyorsa suyla veya uygun başka temizleme yöntemleriyle kalan test maddesi ciltten uzaklaştırılmalıdır.

Tüm hayvanlar günlük olarak gözlenmeli ve başlangıç zamanını da içeren toksisite belirtileri, dereceleri ve süreleri kaydedilmelidir. Gözlemler cilt ve tüylerdeki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki, solunum, dolaşım, otonom ve merkezi sinir sistemindeki değişikliklerle somatomotor aktivitesi ve davranışlarındaki değişikliklerini kapsamalıdır.Ölçümler hayvanların ağırlıklarından haftalık olarak yapılmalıdır. Ayrıca gıda tüketiminin de haftalık olarak ölçülmesi tavsiye edilir. Hayvanların birbirlerini yemeleri, dokuların otolizi veya yanlış yerleştirme gibi nedenlerle kaybedilmediklerinin ispat edilmesi için düzenli olarak gözlenmesi gereklidir. Çalışma süresi sonunda ikincil izleme bulunmayan uygulama grubundaki sağ kalan tüm hayvanlara nekropsi yapılır. Ölmek üzere olan, acı ve ağrı çeken hayvanlar farkına varıldığında uzaklaştırılmalı, insanca öldürülmeli ve hayvanlara nekropsi yapılmalıdır.

Aşağıdaki incelemeler kontrol grupları da dâhil edilerek tüm hayvanlara testin sonunda uygulanır:

(a) Oftalmoskop(göz muayenesinde kullanılan cihaz) ve eşdeğeri uygun bir alet kullanılarak yapılan gözle ilgili incelemeler test maddesine maruz kalmadan önce ve çalışma sonlandırılırken, tercihen tüm hayvanlara, ancak en azından yüksek doz ve kontrol grubundakilere yapılmalıdır. Gözlerde değişikliğe rastlanırsa, tüm hayvanlar incelenmelidir;

(b) Hematokrit, hemoglobin derişimi, eritrosit sayımı, toplam ve türevsel lökosit sayısını ve pıhtılaşma süresini ve filatelet sayımıyla protrombin süresi, tromboplastin süresi veya pıhtılaşma potansiyelinin ölçümünü kapsayan hematolojik incelemeler test süresinin sonunda araştırılmalıdır;

(c) Klinik kan biyokimyası tayinleri test süresi sonunda yapılmalıdır. Tüm çalışmalar için uygun olduğu düşünülen test alanları, elektrolit dengesi, karbonhidrat metabolizması, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarıdır. Özgün testlerin seçimi maddenin etkinlik gösterdiği durumlardan etkilenecektir. Tavsiye edilen tayinler kalsiyum, fosfor, klorür, sodyum, potasyum, açlık glikozu (türler uygun olan açlık süreleriyle) serum glutamik piruvik transaminaz [1], serum glutamik okzaloasetik transaminaz [2], ornitin dekarboksilaz gama glutamil transpeptidaz, üre azotu, albumin, kanda kreatinin, toplam bilirubin ve toplam serum protein ölçümleridir.

Yeterli toksisite değerlendirmeleri için gerekli olabilecek diğer belirlemelere lipidler, hormonlar, asit/baz dengesi, methemoglobin ve kolinesteraz aktivitesi dahildir. Gerekli yerlerde gözlenen toksik etkilerinin araştırılmasını genişletmek için ilave klinik biyokimya uygulamaları yapılabilir.

(d) Temel şartlarda analiz gerekli değildir, fakat yalnızca toksisite tahmini ve gözlemi işaret edildiği zaman yapılır. Geçmişe yönelik tarihsel temel veriler yetersizse, doz uygulanmasına başlamadan önce hematolojik ve klinik biyokimya parametrelerinin belirlenmesi düşünülmelidir.

Tam teşekküllü otopsi

Çalışmadaki bütün hayvanlara tam teşekküllü otopsi yapılmalıdır. Buna, vücudun dış yüzeyindeki tüm ofirisler, kafatası, göğüs ve karın boşluklarının ve bunların içeriklerinin incelenmesi dâhildir. Karaciğer, böbrekler, adrenaller, akciğerler ve testis parçalara ayrıldıktan sonra kurumasından olabildiğince kaçınılarak ıslak ağırlıkları tartılmalıdır. Organlar ve dokular, tüm büyük yaralar, beyin- omur/omurilik, beyincik zarı ve beyin zarı, hipofiz, tiroit/paratiroit ve timik doku (nefes borusu), akciğerler, kalp, aort, tükrük salgıları, karaciğer, dalak, böbrekler, böbreküstü bezleri, pankreas, yumurtalık, mesane, yardımcı üreme organları, safra kesesi (eğer varsa), özofagus, mide, oniki parmak bağırsağı, ince bağırsağın üst kısmı, kıvrım bağırsak, kör bağırsak, kalın bağırsak, rektum, idrar torbası, lenf nodülü, (dişi meme bezi), (uyluk kasları), periferal sinir, (gözler), (sternum ve kemik iliği), (femur – eklem yüzeyi dâhil), (üç düzeyde omurilik – servikal(boyunda), mid-thoracic(göğsün orta kısmında) ve lumbar) ve (eksorbital gözyaşı salgılar). (soluk borusu, karaciğer, böbrekler, dalak, testis, böbreküstü bezleri, kalp ve büyük yaraları olan herhangi bir organ veya büyüklükteki değişiklikler) ileride olası histopatolojik inceleme için uygun bir ortamda muhafaza edilmelidir. Parantez içinde belirtilen dokular sadece toksisite belirtisi gösterdiyse veya hedef organsa incelenir.

Histopatolojik inceleme

(a) Yüksek doz grubunda ve kontrol grubundaki hayvanların normal ve muamele edilmiş ciltleriyle doku ve organlarına tam teşekküllü histopatolojik inceleme yapılmalıdır.
(b) Bütün büyük yaralar incelenmelidir.
(c) Diğer doz gruplarındaki hedef organlar incelenmelidir.
(d) Sıçanlar kullanıldığı zaman düşük ve ara doz gruplarındaki hayvanların akciğerlerine enfeksiyon olup olmadığının anlaşılması için histopatolojik inceleme yapılır, böylece hayvanların sağlık durumları hakkında uygun bir değerlendirme yapılabilir. Bu gruptaki

[1] Şu anda serum alanin aminotransferaz olarak bilinmektedir.
[2] Şu anda serum aspartat aminotransferaz olarak bilinmektedir.

hayvanlar üzerinde rutin olarak daha fazla histopatolojik incelemeye ihtiyaç duyulmayabilir fakat yüksek doz grubunda yara gözlenen organlarda histopatolojik inceleme mutlaka yapılmalıdır.
(e) Bir ikincil izleme grubu kullanıldığında, muamele edilmiş diğer gruplarda etki görüldüğü belirlenen organ ve dokular histolojik olarak incelenmelidir.

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu için, testin başlangıcındaki hayvan sayısını ve her bir yara türüne ait hayvan sayısını gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Gözlenen tüm sonuçlar uygun bir istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Bilinen herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- tür, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli;
- test koşulları;
- doz seviyeleri (kullanıldıysa, taşıyıcının ki de dahil)ve derişim değerleri;
- cinsiyet ve doza bağlı toksik cevap verileri;
- mümkünse etki gözlenmeyen düzey;
- çalışma sırasındaki ölümlerin zamanı veya hayvanların çalışma bitinceye kadar sağ kalıp kalmadıkları;
- toksik etkileri ve diğer etkilerin tanımı;
- her bir anormal belirtinin gözlendiği zaman ve sonraki seyri;
- gıda ve vücut ağırlığı verileri;
- oftalmolojik bulgular,
- uygulanan hematolojik testleri ve tüm sonuçlar,
- uygulanan klinik biyokimya testleri ve tüm sonuçlar (herhangi bir idrara ait kimyasal ve mikroskopik analiz dahil),
- nekropsi bulguları;
- histopatolojik bulgularla ilgili detaylı bilgiler,
- mümkünse sonuçların istatistiksel işlenmesi;
- sonuçların tartışılması.
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.29 SUB –KRONİK SOLUNUM TOKSİSİTE ÇALIŞMASI KEMİRGEN TÜRLERİ KULLANILARAK 90-GÜN TEKRARLI SOLUNUM DOZ ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi, her gün çeşitli gruplardaki deney hayvanlarının derilerine grup başına bir konsantrasyon değeri kullanılarak kademeli konsantrasyonlarla 90 gün boyunca uygulanır. Test maddesinin atmosferde uygun konsantrasyonlarda olmasını sağlamak için bir taşıyıcı kullanılmışsa taşıyıcı kontrol grubu da kullanılmalıdır. Uygulama süresince hayvanlar toksisite belirtilerine karşı her gün gözlemlenir. Test sırasında ölen hayvanlarla deney sonunda hayatta kalan deney hayvanlarına otopsi yapılır.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Hazırlıklar

Hayvanlar deneyden en az beş gün öncesinden itibaren deneysel barınma ve beslenme koşullarında muhafaza edilirler. Test öncesinde, sağlıklı genç hayvanlar rastgele deney ve kontrol grubu olarak ayrılırlar. İhtiyaç duyulan durumlarda, test maddesinin ortamda uygun konsantrasyonda olmasını sağlamak için test maddesine uygun bir taşıyıcı ilave edilebilir, sonrasında taşıyıcı kontrol grubu da kullanılmalıdır. Dozun uygulanmasını kolaylaştırmak için taşıyıcı veya başka katkı maddeleri kullanılacaksa, bu maddelerin toksik etki göstermemeleri gerektiği bilinmelidir. Uygunsa daha önceki veriler kullanılır.

1.6.2. Test koşulları

Deney hayvanları

Beklenmedik belirtiler görülmedikçe tercih edilen tür sıçandır. Yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşları kullanılmalıdır. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişim aralığı,

uygun ortalama değerin %20'sini geçmemelidir. Subkronik bir solunum çalışması uzun süreli bir çalışmanın ön çalışması olarak yürütüldüğü zaman her iki çalışmada da aynı tür ve ırk kullanılmalıdır.

Sayı ve cinsiyet

Her bir maruz kalma konsantrasyonu için en az 20 hayvan (10 dişi ve 10 erkek) kullanılmalıdır. Dişilerin, doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Eğer arada da hayvanların öldürülmesi planlanmışsa çalışma tamamlanmadan öldürülmesi planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır. Ayrıca, 20 hayvandan oluşan bir ikincil izleme grubu (cinsiyet başına 10 hayvan) 90 gün boyunca yüksek doz, düzeyine maruz bırakılabilirler ve uygulama sonrasındaki 28 gün içinde toksik etkilerin tersinirliği, kalıcılığı veya gecikmiş oluşumu açısından gözlemlenmelidirler.

Maruz kalma konsantrasyonları

Kontrol veya taşıyıcı kullanılmışsa, taşıyıcı kontrolü ile birlikte en az üç doz gereklidir (taşıyıcının konsantrasyonu en yüksek düzeyde olmalıdır). Test maddesiyle muamele edilenler dışında, kontrol grubundaki hayvanlar test grubundakilerle aynı şekilde muhafaza edilirler. En yüksek konsantrasyon değerinde toksik etkileri görülmelidir fakat ölüm ya yoktur ya da çok azdır. İnsan maruz kalımıyla ilgili kullanılabilir bir tahmini değer varsa, en düşük doz bunu geçmelidir. İdeal olarak, ara konsantrasyonlar en düşük seviyede gözlenebilir toksik etki meydana getirmelidir. Birden fazla ara konsantrasyon kullanılıyorsa, konsantrasyonlar giderek artan toksik etkileri yaratacak şekilde aralıklandırılmalıdır. Düşük ve ara konsantrasyon gruplarıyla kontrol gruplarındaki ölümlerin olma sıklığı sonuçların anlamlı bir değerlendirilmesinin yapılmasına engel olmayacak kadar düşük olmalıdır.

Maruz kalmasüresi

Günlük maruz kalma süresi, odacık konsantrasyonları dengeye ulaştıktan sonra altı saat olmalıdır. Özel gereklilikleri karşılaması için farklı süreler de kullanılabilir.

Techizat

Hayvanlar, yeterli oksijen içeriği ve eşit olarak dağılmış maruz kalma atmosferi temin etmek için saat başına en az 12 hava değişikliğinde dinamik hava akışı sağlamak amacıyla tasarlanmış soluma techizatında test edilmelidirler. Bu amaçla test hayvanlarının sıkışmaması ve test maddesine solunum yoluyla maruz kalmaları için tasarlanmış bir odacık kullanılmıştır. Genel bir kural olarak, odacığın atmosferinin kararlılığını sağlamak amacıyla test hayvanlarının toplam 'hacimleri' test odacığının hacminin % 5'ini geçmemelidir. Odacıktaki ayrı ayrı, oro-nazal yoluyla, sadece başdan veya tüm bedenden, maruz kalmaları kullanılabilir, ilk ikisi test maddesinin başka yollarla alımını azaltmaya yardımcı olur.

Gözlem süresi

Tüm deney hayvanları toksisite belirtileri için uygulama sonrasında ve iyileşme sürecinde günlük olarak gözlenmelidir. Toksisite belirtilerinin ortaya çıktığı ve kaybolduğu zamanlar ve ölüm zamanları kaydedilmelidir.

1.6.3. İşlem

Hayvanlar test maddesine 90 gün boyunca günlük, haftada beş-yedi gün olarak maruz kalırlar. Herhangi bir ikincil izleme grubunda devam eden gözlemler için programlanan hayvanlar ilave bir 28 gün daha muamele edilmeden tutulmalı, toksik etkileri düzelip düzelmediği belirlenmelidir. Testin uygulandığı sıcaklık 22±3 °C derece olmalıdır. İdeal olarak bağıl nem oranı da % 30 ve %70 arasında olmalıdır, fakat bazı aerosollerin(havada asılı kalan sıvı damlacıkları) testleri gibi belli örneklerde bu durum pratik olmayabilir. Gıda ve su maruz kalma boyunca esirgenmelidir.

Uygun analitik konsantrasyon kontrol sistemi ile birlikte dinamik bir solunum sistemi kullanılmalıdır. Uygun maruz kalma konsantrasyonları elde etmek için deneme testi tavsiye edilir.Hava akımı maruz kalma odacığındaki koşulların homojen olacağı şekilde ayarlanmalıdır. Sistem kararlı maruz kalma koşullarını olabildiğince hızlı bir şekilde sağlamalıdır.

Aşağıda belirtilen ifadelerin ölçüm veya kontrolleri yapılmalıdır:

(a) hava akışının hızı (sürekli).

(b) test maddesinin nefes alma bölgesindeki mevcut konsantrasyonu .Günlük maruz kalma süresi boyunca konsantrasyon, ortalama değerin % ±□15'inden daha fazla değişkenlik göstermemelidir.

Ne var ki, tozlar ve aerosollerin söz konusu olduğu durumlarda bu düzeyde kontrol sağlanması mümkün değildir daha geniş bir aralık kabul edilebilir. Çalışmanın toplam süresi boyunca günden güne konsantrasyonlar olabildiğince sabit tutulmalıdır. Üretim sistemi geliştirilirken kararlı aerosol konsantrasyonları oluşturmak için parçacık büyüklüğü analizi yapılmalıdır. Maruz kalma sırasında parçacık-büyüklük dağılımının tutarlılığının belirlenmesi için analiz olabildiğince sık aralıklarla yürütülmelidir.

(c) sıcaklık ve nem;

(d) Maruz kalma sırasında ve maruz kalmayı takiben gözlem yapılır ve yapılan gözlemler sistematik olarak kaydedilir. Kayıtlar her bir hayvan için ayrı ayrı tutulmalıdır. Tüm hayvanlar günlük olarak gözlemlenmeli ve başlangıç zamanını da içeren toksisite belirtileri, dereceleri ve süreleri kaydedilmelidir. Gözlemler cilt ve tüylerdeki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki, solunum, dolaşım, otonom ve merkezi sinir sistemindeki değişikliklerle somatomotor aktivite ve davranışlarındaki değişikliklerini kapsamalıdır. Haftalık besin tüketimi ölçümleri yapılmalı ve hayvanlar haftada 1 kez tartılmalıdır. Yamyamlık (birbirlerini yeme), dokuların otolizi veya yanlış yerleştirme gibi nedenlerle kaybedilmediklerinin ispat edilmesi için hayvanların düzenli olarak gözlenmesi gereklidir. Çalışma süresi sonunda uygulama grubundaki sağ kalan tüm hayvanlara otopsi yapılır. Ölmek üzere olan, acı ve ağrı çeken hayvanlar farkına varıldığında uzaklaştırılmalı, insanca öldürülmeli ve hayvanlara otopsi yapılmalıdır.

Aşağıdaki incelemeler kontrol grupları da dahil edilerek tüm hayvanlara testin sonunda uygulanır:

(a) Oftalmoskop ve eşdeğeri uygun bir alet kullanılarak yapılan göz ile ilgili incelemeler test maddesine maruz kalımdan önce ve çalışma sonlandırılırken, tercihen tüm hayvanlara ancak en azından yüksek doz ve kontrol grubundakilere yapılmalıdır. Gözlerde değişikliğe rastlanırsa, tüm hayvanlar incelenmelidir;

(b) hematoloji, hematokrit hemoglobin konsantrasyon eritrosit sayısı, toplam ve türevsel lökosit sayısı ve pıhtılaşma potansiyelini ölçen pıhtılaşma zamanı,tromboblastin zamanı veya platelet zamanı gibi değerler test süresinin sonunda araştırılmalıdır.

(c) Klinik kan biyokimyası tayinleri test süresi sonunda yapılmalıdır. Tüm çalışmalar için uygun olduğu düşünülen test alanları, elektrolit dengesi, karbonhidrat metabolizması, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarıdır. Özgün testlerin seçimi maddenin etkinlik gösterdiği durumlardan etkilenecektir. Tavsiye edilen tayinler kalsiyum, fosfor, klorür, sodyum, potasyum, açlık glikozu (türler uygun olan açlık süreleriyle) serum glutamik piruvik transaminaz[1], serum glutamik okzaloasetik transaminaz[2], ornitin dekarboksilaz, gama glutamil transpeptidaz, üre azotu, albumin, kanda kreatinin, toplam bilirubin ve toplam serum protein ölçümleridir.Yeterli toksisite değerlendirmeleri için gerekli olabilecek diğer belirlemelere lipitler, hormonlar, asit/baz dengesi, methemoglobin ve kolinesteraz etkinliği dahildir.
Gerekli yerlerde gözlenen toksik etkilerin araştırmasını genişletmek için ilave klinik biyokimya uygulamaları yapılabilir.

(d) Urinaliz temel şartlarda gerekli değildir, fakat yalnızca toksisite tahmini ve gözlemi işaret edildiği zaman yapılır. Geçmişe yönelik temel veriler yetersizse, doz uygulanmasına başlamadan önce hematolojik ve klinik biyokimya parametrelerinin belirlenmesi düşünülmelidir.

Tam teşekküllü otopsi

Çalışmadaki bütün hayvanlara tam teşekküllü otopsi yapılmalıdır. Buna, vücudun dış yüzeyindeki tüm orifisler, kafatası, göğüs ve karın boşluklarının ve bunların içeriklerinin incelenmesi dahildir. Karaciğer, böbrekler, adrenaller, akciğerler ve testis parçalara ayrıldıktan sonra kurumasından olabildiğince kaçınılarak ıslak ağırlıkları tartılmalıdır. Organlar ve dokular, tüm büyük yaralar, beyin- omur/omurilik, beyincik zarı ve beyin zarı, hipofiz, tiroit/paratiroit ve timik doku (trakea), akciğerler, kalp, aort, tükrük salgıları, karaciğer, dalak, böbrekler, böbreküstü bezleri, pankreas, yumurtalıklar, mesane, yardımcı üreme organları, safra kesesi (eğer varsa), özofagus, mide, duedunum,jejenum, ileum, kör bağırsak, kalın bağırsak, rektum, idrar torbası, lenf nodülü, (dişi meme bezi), (uyluk kasları), periferal sinir, (gözler), (sternum ve kemik iliği), (femur – eklem yüzeyi dahil), (üç düzeyde omurilik – servikal(boyunda), mid-thoracic(göğsün orta kısmında) ve lumbar) ve (eksorbital gözyaşı salgılar). (soluk borusu, karaciğer, böbrekler, dalak, testis, adrenaller, kalp ve büyük yaraları olan herhangi bir organ veya büyüklükteki değişiklikler) ileride olası histopatolojik inceleme için uygun bir ortamda muhafaza edilmelidir. Parantez içinde belirtilen dokular sadece toksisite belirtisi gösterdiyse veya hedef organsa incelenir.

Histopatolojik inceleme

[1]Şu anda serum.alanin aminotransferaz olarak bilinmektedir
[2]Şu anda serum aspartat aminotransferaz olarak bilinmektedir.

(a) Yüksek doz grubunda ve kontrol grubundaki hayvanların solunum yollarına ve diğer organ ve dokularına tam teşekküllü histopatolojik inceleme yapılmalıdır.

(b) Bütün büyük yaralar incelenmelidir.

(c) Diğer doz gruplarındaki hedef organlar incelenmelidir.

(d) Düşük ve ara düzeydeki doz gruplarındaki hayvanların akciğerlerine histopatolojik inceleme yapılmalıdır; böylece hayvanların sağlık durumları hakkında uygun bir değerlendirme yapılabilir. Bu gruptaki hayvanlar üzerinde rutin olarak daha fazla histopatolojik incelemeye ihtiyaç duyulmayabilir fakat yüksek doz grubunda yara gözlenen organlarda histopatolojik inceleme mutlaka yapılmalıdır

(e) Bir ikincil izleme grubu kullanıldığında, muamele edilmiş diğer gruplarda etki görüldüğü belirlenen organ ve dokular histolojik olarak incelenmelidir.

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu için, testin başlangıcındaki hayvan sayısını, yara oluşmuş hayvan sayısını, yara tiplerini ve her yara tipine sahip hayvan yüzdesini gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Gözlenen tüm sonuçlar uygun bir istatiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Bilinen herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- tür, ırk, kaynak, çevresel koşullar, diyet şekli;
- test koşulları;

  Maruz kalma düzeneğinin tarifi: tasarım, tip, boyutlar, hava kaynağı, parçacıklar ve aerosoller yaratan sistem, havalandırma yöntemi, dışarı atılan havanın muamele edilmesi ve bununla hayvanların test odacığında barındırılması için kullanılan yöntemi içerir.. Sıcaklık, nem ve uygun durumlarda aerosol konsantrasyonu veya parçacık büyüklüğünün kararlılığını ölçme techizatı tarif edilmelidir.

  Maruz kalma verileri: çizelge haline getirilmeli ve ortalama değerler ve değişkenlik ölçümü (ör. standart sapma) ve aşağıda belirtilenler dahil edilmelidir:

  (a) soluma cihazındaki hava akış hızları
  (b) havanın nemi ve sıcaklığı;
  (c) sayısal konsantrasyonlar (solunum cihazına verilen test maddesinin toplam miktarının, havanın hacmine bölümü)
  (ç) taşıyıcının yapısı, eğer kullanıldıysa;

(d) test solunum bölgesindeki gerçek konsantrasyon
(e) ortanca parçacık boyutu (uygun olduğunda),

- cinsiyet ve konsantrasyon ile toksisite – cevap verisi;
- etki gözlenmeyen düzey (mümkün olduğunda);
- çalışma sırasındaki ölümlerin zamanı veya hayvanların çalışma bitinceye kadar sağ kalıp kalmadıkları;
- toksik etkiler ve diğer etkilerin tanımı;
- her bir anormal belirtinin gözlendiği zaman ve sonraki seyri;
- gıda ve vücut ağırlığı verileri;
- göz muayenesine dayalı bulgular,
- uygulanan hematolojik testleri ve tüm sonuçlar,
- uygulanan klinik biyokimya testleri ve tüm sonuçlar (herhangi bir idrara ait kimyasal ve mikroskopik analiz dahil),
- otopsi bulguları;
- histopatolojik bulgularla ilgili detaylı bilgiler,
- uygun olduğunda sonuçların istatistiksel uygulaması;
- sonuçların tartışılması;
- sonuçların değerlendirilmesi.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.30 KRONİK TOKSİSİTE TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (A).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi, normal olarak çeşitli gruplardaki deney hayvanlarına, grup başına tek doz olacak şekilde haftanın yedi günü uygun bir yolla, yaşam sürelerinin önemli bir kısmında uygulanır. Test maddesine maruz kalma öncesinde ve sonrasında, deney hayvanları toksisite belirtilerine karşı günlük olarak gözlenirler.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Hayvanlar testten beş gün öncesinden deneysel beslenme ve barınma koşulları altında tutulurlar. Testten önce sağlıklı ve genç hayvanlar rastgele kontrol ve uygulama gruplarına ayrılırlar.

Test koşulları

Deney hayvanları

Tercih edilen tür sıçandır. Daha önceki çalışma sonuçlarına dayanılarak diğer türler (kemirgen veya kemirgen olmayan) kullanılabilir. Genç sağlıklı hayvanların yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşları kullanılmalıdır ve dozun uygulanmasına, sütten kesildikten sonra mümkün olduğunca erken başlanmalıdır. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin % 20'sini geçmemelidir. Subkronik (belli bir süre devam eden) bir oral toksisite çalışması uzun süreli bir çalışmanın ön çalışması olarak yürütülüyorsa, her iki çalışmada da aynı tür/cins ve ırktan hayvanlar kullanılmalıdır.

Sayı ve cinsiyet

Kemirgenlerde her bir doz ve eş zamanlı kontrol grubu için en az 40 hayvan (20 dişi ve 20 erkek) kullanılmalıdır. Dişilerin, hiç doğum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Eğer aralarda da hayvanların feda edilmesi planlanıyorsa çalışma tamamlanmadan öldürülmesi planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır. Kemirgen olmayan hayvanlarda ise, daha az sayıda fakat. her grup ve her cinsiyet başına en az dört hayvan kullanılması kabul edilmiştir.

Doz seviyeleri ve maruz kalma sıklığı

Eş zamanlı kontrol grubuna ilave olarak en az üç doz kullanılmalıdır. En yüksek doz çok fazla ölüme neden olmadan belirgin toksisite etkisi oluşturmalıdır. En düşük doz herhangi bir toksisite belirtisi oluşturmamalıdır.

Ara doz(lar), yüksek ve düşük doz arasında belirlenmelidir.

Doz seviyelerinin seçiminde, önceki toksisite testlerinden ve çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alınmalıdır.

Maruz kalma sıklığı normal şartlarda günlüktür. Eğer kimyasal içme suyuyla veya besinle karıştırılarak veriliyorsa, bu sürekli olmalıdır.

Kontroller

Test maddesine maruz kalma dışında, uygulama gruplarına her hususta eşdeğer olan eş zamanlı bir kontrol grubu kullanılmalıdır. Aerosolleri (havada asılı sıvı damlacıklar bulunduran hava ortamı) kapsayan solunumla ilgili çalışmalar veya ağız yoluyla ilgili çalışmalarda tanımlanmamış bir biyolojik aktivite emülsiyonlaştırıcısı kullanılması gibi özel durumlarda, eş zamanlı negatif kontrol grubu ayrıca kullanılmalıdır. Negatif kontrol grubu test maddesine veya herhangi bir taşıyıcıya maruz kalmayan hayvanlar haricinde test gruplarıyla aynı şekilde muamele edilir.

Uygulama yolu

İki ana uygulama yolu ağız ve solunum'dur. Uygulama yolunun seçimi test maddesinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve insandaki muhtemel maruz kalma yoluna bağlıdır.

Deri yolunun kullanılması önemli pratik problemler oluşturur. Perkütan absorbsiyondan kaynaklanan kalıcı sistemik toksisite, normalde ağız yoluyla ilgili başka bir testin sonuçlarından ve daha önceki perkütan toksisite testlerinden elde edilen perkütan absorbsiyonun kapsamına dair bilgilerden çıkartılabilinir.

Oral yolla ilgili çalışmalar

Test maddesinin mide ve bağırsaklarda emildiği durumlarda ve yutma yolu insanların maruz kalabileceği yollardan biriyse, beklenmedik etkiler olmadığı sürece uygulamanın oral yolla yapılması tercih edilir. Hayvanlar test maddesini besinle, içme suyunda çözünmüş olarak veya kapsül şeklinde alabilirler. İdeal olarak haftada yedi gün, günlük olarak doz uygulaması yapılır çünkü haftada beş gün doz verilmesi, doz verilmeyen sürede toksisite etkilerin

iyileşmesine ya da yok olmasına neden olabilir ve bundan dolayı sonuçları ve sonradan yapılan yorumları etkiler. Ancak, pratik düşüncelere dayanarak haftada beş gün doz uygulaması da kabul edilebilir.

Solunumla ilgili çalışmalar

Solunumla ilgili çalışmalar diğer uygulama yollarından daha karmaşık teknik problemler yarattığından, burada bu uygulama yoluyla ilgili detaylı bir yol gösterim sunulmuştur. Özel durumlarda soluk borusu için solunumun geçerli bir alternatif oluşturacağı not edilmelidir. Uzun süreli maruz kalmalar genellikle planlanmış insan maruz kalmaya göre şekillendirilir. Hayvanlara gerek günlük olarak odacığın dengeye ulaşmasından sonraki altı saat, haftanın beş günü (aralıklı maruz kalma) veya olası çevresel maruziyet ile ilgili olarak haftada yedi gün, günde 22-24 saat (sürekli maruz kalma), yaklaşık olarak bir saat hayvanları günlük olarak beslendikten sonra benzer zamanlarda ve odacığın içinde muamele yapılır. Her iki durumda da hayvanlar genellikle test maddesinin sabit derişimlerine maruz kalırlar. Aralıklı ve sürekli maruz kalma arasındaki temel fark, ilkinde hayvanların günlük maruz kalmanın etkilerini iyileştirebilecekleri 17-18 saatlik, hatta hafta sonları için daha uzun bir süre olmasıdır. Aralıklı veya sürekli maruz kalma seçimi çalışmanın amaçlarına ve benzerinin uygulanacağı insan maruz kalımına bağlıdır. Ancak, belli teknik zorluklar göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, çevresel şartların benzerliği için sürekli maruz kalımınavantajları maruz kalma sırasındaki beslenme ve su içme ihtiyacıyla, uygulanabilir daha karmaşık aerosol ve buhar ihtiyacıyla, izleme tekniklerinin üretilmesiyle dengelenebilir.

Maruz kalma odacıkları

Hayvanlar, yeterli oksijen içeriği ve eşit olarak dağılmış maruz kalma atmosferi temin etmek için saat başına en az 12 hava değişikliğinde dinamik hava akışı sağlamak amacıyla tasarlanmış soluma odacıklarıyla test edilmelidirler. Kontrol ve maruz kalma odacıklarının yapıları ve tasarımları, test maddesine maruz kalma dışındaki tüm hususlarda maruz kalma koşullarını karşılaştırılabilir kılmak için, eşdeğer olmalıdır. Test maddesinin etrafa kaçak yapmasını engellemek amacıyla, genellikle, odacığın içinde hafif bir negatif basınç sağlanır. Odacıklar, test hayvanlarının sıkışmasını en aza indirmelidir. Genel bir kural olarak, odacığın atmosferinin kararlılığını sağlamak amacıyla test hayvanlarının toplam 'hacimleri' test odacığının hacminin % 5'ini geçmemelidir.

Ölçümler ve izleme aşağıdaki gibi olmalıdır:

(i)Hava akışı: Hava akışının hızı odacık içinde tercihen sürekli izlenmelidir;.

(ii)Derişim: Günlük maruz kalma süresi boyunca test maddesinin derişimi, ortalama değerin %±15'inden daha fazla değişkenlik göstermemelidir;

(iii)Sıcaklık ve nem: kemirgenler söz konusuysa, test maddesini askıda bırakmak için su kullanılan durumlar haricinde test atmosferinde sıcaklık 22 ±2 °C ve nem oranı da % 30 ve %70 arasında olmalıdır. Tercihen her ikisi de sürekli izlenmelidir;

(iv) Parçacık boyutu ölçümleri: parçacık boyutu dağılımı sıvı veya katı aerosol içeren bir odacık ortamında tayin edilmelidir. Aerosol partikülleri kullanılan deney hayvanlarının soluyabileceği büyüklükte olmalıdır. Oda atmosferinden alınan örnekler hayvanların soluk alma bölgesinde olmalıdır. Hava örneği, hayvanların maruz kaldığı parçacık dağılımını

yansıtmalı ve gravimetrik temelde askıda kalan tüm aerosolleri, hatta solunabilir olmayanları bile açıklamalıdır. Parçacık boyutu analizleri, aerosolün kararlılığını sağlamak için ve sonrasında da maruz kalmalar sırasında gereken sıklıkta, hayvanların maruz kaldığı parçacık dağılımının tutarlılığını yeterli şekilde tayin etmek için çoğunlukla sistem üretiminin geliştirilmesi sırasında yürütülmelidir.

Çalışmanın uzunluğu

Uygulama süresinin uzunluğu en az 12 ay olmalıdır.

İşlem

Gözlemler

Günde en az bir kez dikkatli bir klinik inceleme yapılmalıdır. Çalışmada ölen hayvan sayısını en aza indirmek için, örneğin, ölü bulunan hayvanlara nekropsi yapılması, zayıf ya da ölmek üzere olan hayvanların gözden çıkarılmaları, uygun hareket edilerek ilave gözlemler günlük olarak yapılabilir. Toksik etkilerin başlangıcının ve ilerlemesinin belirlenmesi yanında hastalık, otoliz ve birbirlerini yemeden kaynaklanan kayıpları azaltmak için dikkatli gözlemler yapılmalıdır.

Ölüm, nörolojik ve gözle görülür değişiklikler yanında klinik belirtiler tüm hayvanlar için kaydedilmelidir. Şüpheli tümörler gibi toksik koşulların başlama ve ilerlemesi kaydedilmelidir.

Vücut ağırlıkları tüm hayvanlar için testin ilk 13 haftası boyunca haftada bir defa ve sonrasında da her dört haftada en az bir kere ayrı ayrı kaydedilmelidir. Gıda alımı, çalışmanın ilk 13 haftasında haftalık olarak belirlenmelidir, daha sonra yaklaşık üç aylık aralıklarla sağlık durumu ve vücut ağırlığı durumu aksini gerektirmedikçe ayrı ayrı kaydedilmelidir.

Hematolojik incelemeler

Hematolojik inceleme (ör. Hemoglobin içeriği; hematokrit, toplam kırmızı kan hücresi, toplam beyaz kan hücresi, trombositler veya pıhtılaşma potansiyelinin diğer ölçümleri) üçüncü ayda, altıncı ayda ve sonrasında da yaklaşık altı aylık aralıklarla ve deney sonlandırılmadan önce yapılmalıdır. İncelemeler kemirgen olmayan hayvanlardan ve 10 sıçan/cinsiyet şeklinde tüm gruplardan alınan kan örneklerinde yapılır. Eğer mümkünse, örnekler aynı aralıkta aynı sıçanlardan alınmalıdır. İlaveten, kemirgen hayvanların haricindeki hayvanlardan ön test için de numune alınmalıdır.

Eğer klinik gözlemler çalışma sırasında hayvanın sağlığında kötüye gidiş gösterirse, etkilenen hayvanların türevsel kan sayımları yapılmalıdır.

Türevsel kan sayımı en yüksek doz grubundaki hayvanlarla ve kontrol hayvanlarından alınan örneklerde yapılır. Türevsel kan sayımı bir sonraki düşük doz grubu(grupları) için sadece en yüksek grup ve kontrol arasında çok büyük bir tutarsızlık varsa veya böyle bir durum patolojik bulgularla gösteriliyorsa yapılır.

İdrar tahlili

İdrar örnekleri tüm kemirgen olmayan hayvanlardan ve 10 sıçan/cinsiyet şeklinde tüm gruplardan, eğer mümkünse, hematolojik incelemede olduğu gibi aynı aralıktaki aynı sıçanlardan analiz için toplanmalıdır. Aşağıdaki incelemeler her bir hayvan için ayrı ayrı ya da kemirgenler için bir araya getirilen örnek/cinsiyet/gruplarda yapılır:

-görüntü: her bir hayvan için ayrı ayrı hacim ve yoğunluk,
-protein, glukoz, ketonlar, gizli kan (yarı-nicel olarak),
-sediment mikroskobisi(yarı-nicel olarak),

Klinik kimya

Yaklaşık altı aylık aralıklarla ve başlangıçta, kan örnekleri klinik biyokimya incelemeleri için tüm kemirgen olmayan hayvan gruplarından 10 sıçan/cinsiyet olacak şekilde, eğer uygunsa, alınır. İlaveten, kemirgen olmayan hayvanlardan öntest için de numune alınmalıdır.

Plazma bu örneklerden hazırlanır ve aşağıdaki tayinler yapılır:
- toplam protein konsantrasyonu,
- albumin konsantrasyonu,
- karaciğer fonksiyon testleri (alkalin fosfataz aktivitesi, glutamik piruvik transaminaz [1] aktivitesi ve glutamik okzaloasetik transaminaz[2] aktivitesi), gamma glutamil transpeptidaz, ornitin dekarboksilaz,
- açlık kan şekeri gibi karbonhidrat metabolizması,
- kan üre azotu gibi böbrek fonksiyon testleri

Kapsamlı otopsi

Çalışmadaki deney sırasında ölenler ve ölmek üzere olup öldürülenler de dahil bütün hayvanlara tam teşekküllü nekropsi yapılmalıdır. Hayvanlar gözden çıkarılmalarından önce türevsel kan sayımı için tüm hayvanlardan kan örnekleri toplanmalıdır. Bütün büyük görülebilen yaralar, tümörler veya tümör şüphesi olan yaralar muhafaza edilirler. Büyük ölçekteki gözlemlerle mikroskobik bulgular arasında korelasyon sağlanmasına çalışılmalıdır.

Tüm organ ve dokular histopatolojik inceleme için muhafaza edilmelidirler. İncelenen doku ve organlar aşağıdaki gibidir: beyin [3] (omur/omurilikler, beyincik zarı, beyin zarı), hipofiz tiroit (paratiroit dahil), timus, akciğerler (soluk borusu dahil), kalp, aort, tükrük bezleri, karaciğer (3), dalak, böbrekler (3), böbrek üstü bezleri (3), özofagus, mide, oniki parmak bağırsağı, ince bağırsağın üst kısmı, kıvrım bağırsak, kör bağırsak, kalın bağırsak, rektum, mesane, idrar kesesi, lenf nodülleri, pankreas, yumurtalıklar (3), yardımcı cinsiyet organları, dişi meme bezleri, deri, kas sistemi, periferal, sinir, omurilik (servikal, göğüsler, lumbar), kemik iliği ve femurlu göğüs kemiği, (eklem dahil) ve gözler. Akciğerlerin şişirilmesi ve idrar kesesinin sabitleyiciyle muamele edilmesi bu dokuları muhafaza etmek için en iyi yoldur. Solunum çalışmalarında akciğerlerin şişirilmesi uygun histopatolojik inceleme için önemlidir.

---

[1] serum alanin aminotransferaz olarak bilinir.
[2] serum aspartat aminotransferaz olarak bilinir.
[3] Kemirgenler ve kemirgen olmayan hayvanlar için grup ve cinsiyet başına 10 hayvandan alınan bu organlar artı kemirgen olmayanlardan alınan tiroid (paratiroidle birlikte) tartılmalıdır.

Solunum çalışmaları gibi özel çalışmalarda burun, yutak ve gırtlak dahil tüm soluk alıp verme yolu çalışılmalıdır.

Diğer klinik incelemeler yapıldığı takdirde, bu işlemlerden elde edilecek bilgiler mikroskobik incelemelerden önce elde mevcut olmalıdır çünkü bu bilgiler patologlar için anlamlı bir yol gösterici olabilir.

Histopatoloji

Gözle görünür bütün değişiklikler özellikle tümörler ve herhangi bir organda oluşan diğer yaralar mikroskobik olarak incelenmelidir. İlaveten, aşağıdaki işlemler tavsiye edilir:

(a)Bulunan bütün lezyonları tam olarak tanımlanmış, tüm korunmuş organ ve dokuların mikroskobik incelemeleri:

1. çalışma sırasında ölen ve öldürülen tüm hayvanlar;
2. tüm yüksek doz grubu ve kontroller;

(b)Test maddesinden kaynaklanan veya kaynaklanma olasılığı olan organ ve dokularda sergilenen anomaliler de düşük doz gruplarında incelenir;

(c)Sonuçlar, hayvanların normal yaşam sürelerinde önemli bir azalma veya toksik cevabı etkileyebilecek bir etki gösteriyorsa, bir sonraki düşük doz yukarıda anlatıldığı gibi incelenmelidir.

(d)Kullanılan hayvan ırkında normal yaraların oluşma sıklığıyla ilgili bilgi, aynı laboratuvar koşulları altında, örneğin; geçmişe yönelik kontrol verileri, muamele edilen hayvanlardaki anlamlı değişiklikleri doğru değerlendirmek için vazgeçilmez öneme sahiptir.

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu için, testin başlangıcındaki hayvan sayısını, yaralı hayvan sayısını ve her bir yara türüne ait hayvanların yüzdesini gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Gözlenen tüm sonuçlar uygun bir istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Bilinen herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- Tür, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli;
- test koşulları;

Maruz kalma düzeneğinin tarifi:

Tasarım, tip, boyutlar, hava kaynağı, parçacık ve aerosol üreten sistem, havalandırma yöntemi, dışarı atılan havanın muamele edilmesi ve bununla hayvanların test odacığında

barındırılması için kullanılan yöntemi içerir. Sıcaklık, nem ve uygun durumlarda aerosol derişiminin veya parçacık büyüklüğünün kararlılığını ölçme teçhizatı tarif edilmedilir.

Maruz kalma verileri: çizelge haline getirilmeli ve ortalama değerler ve değişkenlik ölçümü (örneğin; standart sapma) ve aşağıda belirtilenler dahil edilmelidir:

(a) Soluma cihazındaki hava akış hızları
(b) Havanın nemi ve sıcaklığı;
(c) Sayısal derişimler (havanın hacmine bölünmüş solunum yapılan cihazdaki test besleme maddesinin toplam miktarı)
(d) taşıyıcının yapısı, eğer kullanıldıysa;
(e) solunum bölgesindeki gerçek konsantrasyon
(f) medyan parçacık boyutu (uygun yerlerde),

- doz seviyeleri ve derişimler,
- cinsiyet ve doza göre toksik - cevap verisi,
- etki gözlenmeyen düzey,
- çalışma sırasındaki ölümlerin zamanı veya hayvanların çalışma bitinceye kadar sağ kalıp kalmadıkları;
- toksik etkiler ve diğer etkilerin tanımı;
- her bir anormal belirtinin gözlendiği zaman ve sonraki seyri;
- gıda ve vücut ağırlığı verileri;
- göz muayenesine dayalı bulgular,
- uygulanan hematolojik testleri ve tüm sonuçlar,
- uygulanan klinik biyokimya testleri ve tüm sonuçlar (herhangi bir idrara ait kimyasal ve mikroskopik analiz dahil),
- nekroskopi bulguları;
- histopatolojik bulgularla ilgili detaylı bilgiler,
- uygun olduğunda sonuçların istatistiksel işlenmesi;
- sonuçların tartışılması;
- sonuçların değerlendirilmesi.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (D).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (E).

B.31. PRENATAL GELİŞİMSEL TOKSİSİTE ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 414 (2001)'e eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Gelişimsel toksisite test uygulama yöntemi, hamile test hayvanı ve rahimdegelişmekte olan organizma üzerindeki doğum öncesi etkilerine dair genel bilgi sağlamak için tasarlanmıştır; bunlar arasında ölüm gibi maternal etkilerin değerlendirilmesi, yapısal anomali veya fetüsün gelişimiyle ilgili değişiklikler içerebilir. Fonksiyonel bozukluklar, her ne kadar gelişimin önemli bir bölümüyse de, bu yöntemin bütününü oluşturmaz. Ayrı bir çalışmada test edilebilirler veya gelişimsel nörotoksisite için test yöntemleri kullanılarak bu çalışmaya ilave edilebilirler. Fonksiyonel bozukluklar ve diğer doğum sonrası etkilerle ilgili test uygulamaları hakkında bilgi edinmek için iki nesilli üremeye karşı toksisite çalışması olan test yöntemine ve gelişimsel nörotoksisite çalışmalarına başvurulması uygun olacaktır.

Bu yöntem bireysel durumlarda test maddesinin örneğin fizikokimyasal ve toksikolojik özellikleriyle ilgili özel bilgilere dayanarak özel uyarlamalar gerektirebilir. Böyle uyarlamalar bilimsel kanıtların, uyarlamanın daha bilgilendirici bir test oluşturduğuna ikna ettiği durumlarda kabul edilebilirdir. Böyle bir durumda, bilimsel kanıt, çalışma raporunda dikkatli bir şekilde belgelendirilmelidir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Gelişimsel toksikoloji: Gelişmekte olan organizmalardaki döllenmeden önce, doğum öncesi gelişim sırasındaki veya doğum sonrası gelişimden cinsel olgunluğa ulaşıncaya kadar olan maruz kalmalardan kaynaklanan olumsuz etkilerin çalışıldığı alan. Gelişimsel toksisitenin esas göstergeleri 1) organizmanın ölümü, 2) yapısal anomaliler, 3) büyüme değişiklikleri, ve 4) fonksiyonel yetersizlikleri içerir. Gelişimsel toksikoloji daha önceden sıklıkla teratoloji (oluşumundaki biçimsizlik ve anomalileri içeren bilim) olarak bilinen bir terimdir.

Olumsuz etki: Organizmanın hayatta kalma, üreme ve çevreye uyum sağlama yeteneğini azaltan herhangi bir muameleye bağlı temelde meydana gelen değişiklik. Gelişimsel toksikoloji göz önünde bulundurularak, kapsamlı algılamada belirlenmiş, konseptüsün (fetüs) doğumdan önceki ve sonraki normal gelişimiyle etkileşen herhangi bir etkiyi içine alır.

Büyüme değişiklikleri: dölün organ veya vücut ağırlığında veya büyüklüğünde meydana gelen değişikliklerdir.

Değişiklikler (anomaliler): Şekil bozuklukları (malformasyon) ve değişikliklerini içine alan, gelişimdeki yapısal değişiklikler (28).

Şekil bozukluğu (Malformasyon)/Büyük Anomali: Hayvanda zararlı (ayrıca öldürücü olabilir) olacağı düşünülen yapısal değişikliktir ve nadir görülür.

Varyasyon/Küçük Anomali: Hayvanda zararlı etkisinin çok az olacağı veya olmayacağı düşünülen yapısal değişiklik, geçici olabilir ve göreceli olarak sıkça kontrol popülasyonlarında da görülebilir.

Konseptüs (gebelik): Döllenmeden doğuma kadar olan gelişimin herhangi bir aşamasındaki döllenmiş yumurtanın ekstra-embriyonik zarlarla beraber embriyo veya fetüsü de içine alan oluşumlarının toplamı

İmplantasyon (nidasyon (aşılanmış yumurtanın uterus mukozasına yerleşmesi)): Blâstosistin (blastula safhasını izleyen gelişim devresindeki gebelik ürünü) uterusun epitelyal yüzeyine tutulması, rahim epitelyumuna nüfuz etmesi ve endometriyuma (Uterus'un mukozası) gömülmesidir.

Embriyo: herhangi bir organizmanın erken veya gelişme safhası, özellikle döllenmiş bir yumurtanın uzun eksen oluşumundan tüm esas yapılar oluşuncaya kadar olan gelişme ürünü

Embriyotoksisite: embriyonun normal yapısına, gelişimine, büyümesine ve/veya yaşayabilirliğine zararlı olan.

Fetüs: post-embriyonik dönemdeki doğmamış döl.

Fötotoksisite: fetüsün normal yapısına, gelişimine, büyümesine ve/vaya yaşayabilirliğine zararlı olan.

Düşük: döllenme ürünlerinin, yani embriyo veya fetüsün, yaşayabilir duruma gelmeden uterusun dışına atılması

Rezorpsiyon: Uterusta implantasyona uğrayan konseptus sonrasında ölür veya yeniden emilir.

Erken rezorpsiyon: embriyo/fetüsün tanınabilir olmadığı aşamada implantasyon olduğunun kanıtı

Geç rezorpsiyon: dış dejeneratif (bozunma) değişikliklerin görüldüğü ölü embriyo veya fetüs

NOAEL:"Hiçbir olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviye

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Normalde test maddesi hamile hayvanlara en azından implantasyondan itibaren planlanan öldürülmeden bir gün öncesine kadar uygulanır, uygulama doğumun normal gününe olabildiğince yakın olmalıdır ve erken doğumdan kaynaklanan veri kaybı riskine girilmemelidir. Test yöntemi sadece organojenez süresini örneğin kemirgenlerde 5-15 gün, tavşanda 6-18 gün) değil ayrıca, uygun olduğunda, tüm hamilelik süresi boyunca, sezeryandan bir gün öncesine kadar preimplantasyon etkileri de incelenir. Sezeryandan kısa bir süre öncesinde, dişiler öldürülür, rahim içerikleri incelenir ve fetüsler dışardan gözle görülebilir anomaliler ve yumuşak doku ve iskeletsel değişiklikler için incelenir.

1.5. Test yönteminin tanımlanması

1.5.1. Hayvan türlerinin seçimi

Testin en uygun türlerde yapılması tavsiye edilir ve doğum öncesi gelişimsel toksisite testlerinde, yaygın olarak kullanılan laboratuvar türleri ve suşları kullanılır. Tercih edilen kemirgen türü sıçan, kemirgen olmayan tür ise tavşandır. Başka bir tür kullanılacağında gerekçe sunulmalıdır.

1.5.2. Barınma ve beslenme koşulları

Deney hayvanları oda sıcaklığı sıçanlar için 22°C (± 3°C), tavşanlar için 18 °C (± 3°) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranı, odanın temizlenmesi sırası dışında, en az %30 olmalı ve tercihen %70'i geçmemelidir. En uygun bağıl nem oranı %50-60'dır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır. Beslenme için, geleneksel laboratuvar yiyecekleri sınırsız içme suyu sağlanmasıyla kullanılabilir. Çiftleşme işlemleri amaca uygun kafeslerde yapılmalıdır. Çiftleştirilen hayvanların ayrı ayrı barındırılması tercih edilirken, küçük gruplar halinde barınmaları da uygun olabilir.

1.5.3. Hayvanların hazırlanması

5 gün öncesinden laboratuvar koşullarına alıştırılan ve daha önce deneysel işlemlere maruz kalmamış olan sağlıklı hayvanlar kullanılmalıdır. Test hayvanları, tür, ırk, kaynak, cinsiyet, ağırlık ve/veya yaşa göre karakterize edilmelidir. Tüm test gruplarındaki hayvanlar olabildiğince tek bir ağırlık ve yaşta olmalıdır. Her doz için genç erişkin nulipar (doğum yapmamış) dişiler kullanılmalıdır. Dişiler aynı ırk ve türün erkekleriyle çiftleştirilmeli ve kardeşlerin çiftleştirilmesinden kaçınılmalıdır. Eğer bu teknik kullanılırsa, sıçanlar için hamileliğin sıfırıncı günü, vajinal plug veya spermin gözlendiği gün; tavşanlar içinse genellikle cinsel ilişki veya suni döllenme günüdür. Kafesler yerleştirilmelerinden kaynaklanan etkileri en aza indirecek şekilde düzenlenmelidirler. Her bir hayvan tek bir kimlik numarasına sahip olmalıdır. Çiftleştirilen dişiler tarafsız şekilde kontrol ve muamele gruplarına ayrılırlar ve eğer dişiler yığın halinde çiftleştirilirse, her bir yığındaki hayvanlar karşısında eşit olarak dağıtılmalıdır. Benzer olarak, aynı erkekle suni olarak döllenen dişiler de grupta eşit olarak dağıtılmalıdır.

1.6. İşlem

1.6.1. Hayvanların sayısı ve cinsiyeti

Otopside, her bir test ve kontrol grubu, implantasyon yerine sahip yaklaşık 20 dişiyle sonuçlanacak yeterli sayıda dişi içermelidir. İmplantasyon yeri olan 16 hayvandan daha az sayıda hayvan içeren gruplar uygun olmayabilir. Maternal ölüm % 10'u geçmediği sürece çalışmanın geçersiz kılınmasına neden olmaz.

1.6.2. Dozların hazırlanması

Eğer doz uygulamasını kolaylaştırmak için bir taşıyıcı veya diğer katkılar kullanılıyorsa, test maddesinin absorbsiyon (emilim), dağılım, metabolizma ve alıkonulması veya atılımı üzerindeki etkiler, maddenin toksik özelliğini değiştirebilecek olan kimyasal özellikleri ve

gıda ve su tüketimiyle ilgili veya hayvanın beslenme durumu üzerine etkiler gibi adı geçen karakteristiklerine önem verilmelidir. Taşıyıcının ne gelişim ne de üreme üzerine toksik etkileri olmamalıdır.

1.6.3. Dozaj

Normalde test maddesi implantasyondan (örneğin çiftleşmeden sonraki 5. gün) sezeryan gerçekleştirilmesi planlanan günün bir gün öncesine kadar günlük olarak uygulanmalıdır. Eğer ön çalışmalar, preimplamantasyon kaybı için yüksek potansiyele işaret etmiyorsa muamele çiftleşmeden başlayarak planlanan öldürmeden bir gün öncesine kadar hamilelik sürecinin tamamını içine alacak şekilde uzatılabilir. Hamilelik sırasındaki uygun olmayan elleçleme veya stres düşükle sonuçlanabilir. Muameleyle ilgili olmayan düşüklerin önüne geçmek için, hamile hayvanların gereksiz elleçleme, gürültü gibi dış faktörlere bağlı stresten kaçınılmalıdır.

En az üç doz ve eş zamanlı kontrol kullanılmalıdır. Sağlıklı hayvanlar tarafsız şekilde kontrol ve muamele grubu olarak ayrılmalıdır. Doz seviyeleri giderek artan toksik etkiler oluşturacak şekilde seçilmelidir. Test maddesinin fiziksel/kimyasal doğası veya biyolojik etkileriyle sınırlanmadıkçaen yüksek doz gelişimsel ve/veya maternal toksisiteyesebep olmalı (klinik belirtiler veya vücut ağırlığında azalma) fakat ölüme veya ciddi rahatsızlıkları yol açmamalıdır.. En az bir ara doz gözlenebilir en düşük toksik etki meydana getirmelidir. En düşük doz maternal veya gelişimsel toksisite belirtisi meydana getirmemelidir. Doz seviyelerinin azalan dizisi dozaja bağlı cevap ve hiç olumsuz etkinin görülmediği en düşük düzeyi (NOAEL) gösterecek şekilde seçilmelidir. İki –dört kat aralıklar azalan doz seviyeleri için genelde uygundur ve dördüncü bir test grubunun ilave edilmesi doz grupları arasında geniş aralıklar kullanılmasına (örneğin 10 kattan daha fazla) genellikle tercih edilir. Her ne kadar amaç maternal NOAEL oluşturmaksa da, böyle bir düzeyi oluşturmayan çalışmalar da kabul edilebilir (1).

Doz seviyeleri mevcut toksisite verilerinin yanında test maddesinin veya ilgili materyallerin metabolizması veya toksikokinetiğiyle ilgili ilave bilgiler de dikkate alınarak seçilmelidir. Bu bilgi doz kürünün yeterliliğinin gösterilmesine yardımcı olacaktır.
Eş zamanlı bir kontrol grubu kullanılmalıdır. Bu grup suni muamele edilmiş bir kontrol grubu olmalı veya test maddesi uygulanırken taşıyıcı kullanılmışsa taşıyıcı-kontrol grubu olmalıdır. Bütün gruplara test maddesi de taşıyıcı da eşit hacimde uygulanmalıdır. Kontrol grubundaki/gruplarındaki hayvan(lar) test grubundakilerle eşit şekilde elleçlenmelidir. Taşıyıcı kontrol grupları taşıyıcıyı kullanılan en yüksek miktarda almalılardır (en düşük muamele grubunda olduğu gibi).

1.6.4. Sınır testi

Eğer bir test tek bir doz için, en az 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün'e eşdeğer doz, bu çalışma için tanımlanan işlemler kullanılarak oral (ağız yoluyla) yolla uygulandığında, gerek hamile hayvanda gerek sonraki kuşaklarda hiçbir olumsuz etkinin gözlenmediği durum meydana getiriyorsa ve eğer yapısal ve/veya metabolik olarak benzer maddelerle ilgili verilere dayanılarak toksisite beklenmiyorsa, o zaman üç doz kullanılarak yürütülen tam bir çalışmanın yapılmasına gerek duyulmayabilir. Beklenen insan maruz kalımı sınır testinde daha yüksek oral doz seviyelerinin kullanılması gerektiğine işaret edebilir. İnhalasyon (solunum) ve dermal (deriye ait) uygulama gibi diğer uygulama yolları için, test maddesinin fiziko-kimyasal özellikleri sıklıkla maruz kalmanın en yüksek ulaşılabilir seviyesini işaret

eder ve onu sınırlar (örneğin, dermal uygulama ciddi lokal (bölgesel) toksisiteye neden olmamalıdır).

1.6.5. Dozların uygulanması

Test maddesi veya taşıyıcı genellikle intübasyonla (boğaza tüp salma) oral olarak uygulanır. Eğer başka bir uygulama yolu kullanılırsa, testi yapan bu uygulama yolu için bir neden belirtmelidir ve bunun yanısıra uygun modifikasyonlar gerekli olabilir (2)(3)(4). Test maddesi her gün yaklaşık aynı zamanda uygulanmalıdır.

Hayvanlara ayrı ayrı verilen dozlar normalde hayvanların ayrı ayrı yakın zamanlı vücut ağırlığı ölçümlerine dayanır. Ancak, hamileliğin son üç ayında doz ayarlanırken dikkat edilmelidir. Mevcut veriler daha fazla maternal toksisiteyi engellemek adına doz belirlenmesinde kullanılmalıdır. Ne var ki, eğer muamele edilen dişilerde daha fazla toksisite not edilirse, bu hayvanların insanca öldürülmeleri gerekir. Eğer bazı hamile hayvanlar daha fazla toksisite belirtisi gösterirse o doz grubuna son verilmesi düşünülmelidir. Madde sonda ile besleme yoluyla uygulandığında, tercihen tek doz olarak gavaj yöntemi veya uygun bir boğaza salınan sonda kullanılarak verilir. Tek seferde uygulanabiliecek sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. 2 ml/100 g vücut ağırlığı kullanılan sulu çözeltiler dışında, hacim 1 ml/100 g vücut ağırlığını geçmemelidir. Taşıyıcı olarak mısır yağı kullanılan durumlarda hacim 0.4 ml/100 g vücut ağırlığını geçmemelidir. Test hacmindeki değişkenlikler konsantrasyonun tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla en aza indirilmelidir.

1.6.6. Dişilerin gözlenmesi

Klinik gözlemler yapılmalı ve tercihen günün aynı zamanlarında doz uygulandıktan sonraki olumsuz etkilerin tepe süresi de dikkate alınarak günde en az bir defa kaydedilmelidir. Hayvanların koşulları ölüm, ölmek üzere olma, uygun davranışsal değişiklikler ve toksisitenin açık olan tüm belirtileri de dahil kaydedilmelidir.

1.6.7. Vücut ağırlığı ve gıda tüketimi

Zamanla birbirine alıştırılmış hayvanların dışardan bir üreticiden sağlandığı durumlarda, hayvanlar hamileliğin 0 ıncı gününde veya 3 günü geçmeden, doz uygulamasının ilk gününde, doz uygulama süresi boyunca en az her 3 günde ve öldürülmesi planlanan günde tartılmalıdır. Gıda tüketimi üç günlük aralıklarla kaydedilmelidir ve vücut ağırlığı belirlemelerinin yapıldığı günlerle çakışmalıdır.

1.6.8. Ölümden sonra yapılan inceleme

Dişiler beklenen doğumdan bir gün önce öldürülmeli. Planlanan öldürme gününden önce düşük veya prematüre (erken doğum) doğum belirtileri gösteren dişiler öldürülmeli ve makroskobik incelemeye tabi tutulmalıdır.

Çalışmanın sonunda veya çalışma süresince ölüm anında dişi yapısal anomaliler ve patolojik değişiklikler için makroskobik incelemeye tabi tutulmalıdır. Dişilerin sezeryan sırasındaki değerlendirmesi ve sonraki fetal analizler tercihen önyargıyı en aza indirmek için muamele grubu hakkında bilgi edinmeden yürütülmelidir.

1.6.9. Uterus içeriğinin incelenmesi

Deney sonlandırıldıktan veya ölümden hemen sonra dölyatağı alınmalı ve hayvanların hamilelik durumu saptanmalıdır. Gebelik görünmeyen dölyatağının hamileliğin olmadığının doğrulanması için tekrar incelenmelidir (5). (örneğin kemirgenler için amonyum sülfit boyama ve tavşanlar için Salewski boyama veya uygun bir alternatif yöntem) Gebe rahim serviksle birlikte tartılmalıdır. Gebe rahmin ağırlıkları çalışma sırasında ölü bulunan hayvanlardan alınmamalıdır. Corpora lutea sayısı hamile hayvanlar için hesaplanmalıdır.

Rahim içeriği embriyonik veya fetal ölümler ve yaşayabilir fetüsler için incelenmelidir. Resorpsiyon derecesi, konseptusun bağıl ölüm zamanını tahmin etmek için tanımlanmalıdır (bakınız kısım 1.2).

1.6.10. Fetüslerin (ceninlerin) incelenmesi

Her bir fetüsün cinsiyet ve vücut ağırlığı belirlenmelidir.
Her bir fetüs dış değişiklikler için incelenmelidir (6).
Fetüsler iskeletsel ve yumuşak doku değişiklikleri için incelenmelidir (örneğin varyasyonlar ve şekil bozuklukları veya anomaliler) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Fetal değişikliklerin sınıflandırılması tercih edilebilir fakat gerekli değildir. Sınıflandırma yapılırken, her sınıfın tanımlanma ölçütleri açıkça belirtilmelidir. Gelişimsel değişikliklerin belirtilerinin izlenmesi için üreme sistemine özel önem verilmelidir.

Kemirgenler için, doğumdan elde edilen yavruların yaklaşık yarısı hazırlanmalı ve iskeletle ilgili değişiklikler için incelenmelidir. Kalan kısım ise yumuşak doku değişiklikleri için hazırlanmalı ve kabul edilmiş veya uygun seri bölme yöntemleri veya dikkatli kaba disseksiyon (bir organı incelemek için parçalara ayırma) teknikleri kullanılarak incelenmelidir. Tavşan gibi kemirgen olmayan hayvanlar için tüm fetüsler hem yumuşak doku hem de iskeletle ilgili değişiklikler için incelenmelidir. Fetüslerin gövdeleri yumuşak doku değişiklikleri ve iskeletle ilgili değişiklikler için dikkatlice kesilip çıkarılarak değerlendirilirler, sonrasında iç kardiyak (kalple ilgili) yapı için ilave işlem gerekebilir (25). Bu durumda yarım fetüslerin kafaları alınmalı ve standart seri bölme yöntemleri (26) veya eşdeğer duyarlı yöntemler kullanılarak yumuşak doku değişim analizleri için incelenirler (gözler, beyin, burun bölgeleri ve dil dahildir). Fetüs gövdeleri ve kalan bozulmuş fetüsler işlenmeli ve iskelet değişiklikleri için kemirgenler için tanımlanan aynı yöntemler kullanılarak incelenmelidir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Veriler ana hayvanlar ve yavruları için ayrı ayrı rapor edilir ve her bir test grubu ve nesil için testin başındaki hayvan sayısını, test sırasında ölü bulunan veya insani nedenlerle öldürülen hayvan sayısını, hamile dişi sayısını, toksisite belirtisi gösteren hayvan sayısını, gözlenen toksisite belirtilerinin, toksik etkilerin başlama zamanı, süresi ve şiddeti dahil, detaylı tanımlarını, embriyo/fetal gözlenenlerin türü ve yavruyla ilgili tüm verileri gösteren bir çizelge halinde özetlenir.

Sayısal sonuçlar uygun istatistiksel yöntemler, yavru veri analizi için bir birim olarak kullanılarak değerlendirilmelidir. Genel kabul görmüş bir istatistiksel yöntem kullanılmalıdır; istatistiksel yöntemler çalışmanın bir parçası olarak seçilmeli ve doğrulanmalıdır. Öldürülmeleri planlanan tarihe kadar sağ kalmayan hayvanlar rapor edilmelidir. Bu veriler, ilgili durumlarda grup ortalamalarında yer alabilir. Bu hayvanlardan elde edilen verilerin anlamlılığı ve dolayısıyla herhangi bir grup ortalamasına dahil edilmesi veya ortalamanın dışında bırakılması gerekçelendirilmeli ve ayrı ayrı yargıya varılmalıdır.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi

Doğum öncesi Gelişimsel Toksisite Çalışmasıyla ilgili bulgular gözlenen etkiler açısından değerlendirilmelidir. Değerlendirmeler aşağıdaki bilgileri içerir:

— maternal ve embriyo/fetal test sonuçları, hayvanların test maddesine maruz kalımıyla tüm bulguların oluş sıklığı ve önemi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi veya böyle bir ilişkinin olmamasını da kapsayacak şekilde;
— eğer sınıflandırma yapılmışsa fetal harici, yumuşak doku ve iskeletsel değişiklikleri sınıflandırma ölçütleri;
— uygun olduğunda, çalışma sonuçlarının yorumlarının geliştirilmesi için geçmişe yönelik veriler;
—tüm yüzdeleri ve endeksleri hesaplarken kullanılan rakamlar;
— çalışma bulgularının uygun istatistiksel analizleri, uygun olduğunda, yöntemin analizi hakkında yeterli bilgi içermelidir, bu yüzden bağımsız biri eleştirmen analizleri değerlendirebilir ve yeniden yapılandırabilir.

Herhangi bir toksik etkinin görülmediği bir çalışmada test maddesinin absorpsiyonu (emilimi) ve biyoyararlanımının oluşturulması için ilave araştırmaların yapılması düşünülmelidir.

2.3. Sonuçların yorumlanması

Doğum öncesi gelişimsel toksisite çalışması hamilelik sırasında ana hayvanların ve sonraki kuşaklarının rahim içindeki gelişimi sırasında bir maddeye tekrarlanan etkileri hakkında bilgi sağlayacaktır. Çalışmanın sonuçları subkronik, üreme, toksikokinetik ve diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla birlikte yorumlanmalıdır. Vurgu hem maternal toksisite açısından genel toksisite hem de gelişimsel toksisite sonlanma noktaları üzerine yapıldığından, çalışmanın sonuçları genel toksisite yokken meydana gelen gelişimsel etkilerle sadece maternal hayvana da toksik olan seviyede indüklenen gelişimsel etkiler arasında ayrımın yapılmasına izin verecektir (27).

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki özel bilgileri içermelidir:

Test maddesi:
- fiziksel doğası ve ilgili yerlerde, fizikokimyasal özellikleri;
- eğer biliniyorsa/oluşturulmuşsa CAS numarası içeren kimlik;

- Saflık.

Taşıyıcı: (eğer uygunsa)
- eğer sudan farklıysa, taşıyıcı seçimi için gerekçe.

Test hayvanları:
- kullanılan türler ve ırk;
- hayvanların sayısı ve yaşı;
- kaynak, barınma koşulları, diyet. vs.;
- testin başında her bir hayvanın ağırlığı,
-

Test koşulları:
- doz seçimi için gerekçe;
- test maddesinin formülasyonu/diyet hazırlanması, ulaşılan konsantrasyon, preparatın kararlılığı ve homojenliğiyle ilgili detaylar;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- mevcut dozun (mg/kg vücut ağırlığı/gün), eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi konsatrasyonunun (ppm) mevcut doza çevrilmesi;
- çevresel koşullar;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar;
-

Sonuçlar:
Doza bağlı maternal toksik cevap verilerini kapsar, fakat onlarla sınırlı değildir:
- testin başındaki hayvanların sayısı, sağ kalan hayvanların sayısı, hamile sayısı ve düşük sayısı, erken doğum yapan hayvanların sayısı;
- çalışma sırasındaki ölüm günü veya hayvanların çalışmanın sonuna kadar yaşayıp yaşamadıkları;
- hayvanların öldürülmeleri planlanan tarihten önce ölen hayvanlardan elde edilen veriler raporlanmalı, fakat gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar yer almamalı;
- her bir anormal klinik belirtinin ve bu belirtilerin gidişatlarının gözlenme günleri;
- vücut ağırlığı, vücut ağırlığı değişikliği ve hamile rahmin ağırlığı, opsiyonel olarak hamile rahmin ağırlığı için düzeltilmiş vücut ağırlığı değişikliği dahildir;
- gıda tüketimi ve eğer ölçülmüşse, su tüketimi;
- otopsi bulguları, rahmin ağırlığı dahildir;
- maternal ve gelişimsel etkilerin NOAEL değerleri rapor edilmelidir.

İmplantlar için doza bağlı gelişimsel sonlanma noktaları aşağıdakileri kapsar,
- corpora lutea sayısı;
- implantasyon sayısı, canlı ve ölü fetüs ve resorpsiyon (emilme) sayısı ve yüzdesi;
- önceki-ve sonraki- implantasyon kayıplarının sayı ve yüzdesi.

Canlı fetüslerde yavrular için doza bağlı gelişimsel sonlanma noktaları aşağıdakileri kapsar,
- canlı dölün sayısı ve yüzdesi;
- cinsiyet oranı
- fetal (cenine ait) vücut ağırlığı, tercihen cinsiyete bağlı ve cinsiyetler birleşik olarak
- harici, yumuşak doku ve iskeletsel şekil bozuklukları ve ilgili diğer değişiklikler;
- eğer uygunsa, sınıflandırma ölçütleri;

- harici, yumuşak doku ve iskeletsel değişiklikler gösteren fetüs ve yavruların toplam sayı ve yüzdesi, yanında bireysel anomalilerin ve diğer ilgili değişikliklerin türü ve oluş sıklığı.

Sonuçların tartışılması

Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

(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 Toxicology14; 386- 398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address
Toxicological Problems. CIIT Activities 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embriyo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Congenital Anomalies 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Fetüses. 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 Fetüses. Journal of Morphology 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Fötal 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 VariationsTeratology 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Gelişimsel Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology 46; 169-181.

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Fetüses 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 Fetüses Used in Teratogenicity Testing. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 4; 181-188.
(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, IL. L 216/234 EN Official Journal of the European Union 16.6.2004
(22) Wilson, J.G. (1965) Embriyological Considerations in Teratology. In Teratology: Principles and Techniques,M 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 Fetüses. 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 Fötal Head. In: Methods in Prenatal ToxicologyNeubert, 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 Gelişimsel Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.'

B.32 KANSEROJENİTE TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Refereans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi, normalde çeşitli gruplardaki deney hayvanlarına, grup başına tek doz olacak şekilde haftanın yedi günü uygun bir yolla, yaşam sürelerinin önemli bir kısmında uygulanır. Test maddesine maruz kalma sırasında ve sonrasında, deney hayvanları toksisite belirtilerine özellikle de tümör oluşumuna karşı günlük olarak gözlenirler.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Hayvanlar testten en az beş gün öncesinden, deneysel beslenme ve barınma koşulları altında tutulurlar. Testten önce sağlıklı ve genç hayvanlar rastgele kontrol ve uygulama gruplarına ayrılırlar.

Deney hayvanları

Daha önceki çalışma sonuçlarına dayanılarak diğer türler (kemirgen veya kemirgen olmayan) kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan genç sağlıklı laboratuvar suşlarına uygulama yapılır ve doz uygulaması mümkün olduğunca sütten kesildikten hemen sonra başlamalıdır.

Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin % 20'sini geçmemelidir. Subkronik bir solunum çalışması uzun süreli bir çalışmanın ön çalışması olarak yürütüldüğü zaman her iki çalışmada da aynı tür ve ırk kullanılmalıdır.

Sayı ve cinsiyet

Kemirgenlerde her bir doz ve eş zamanlı kontrol grubu için en az 100 hayvan (50 dişi ve 50 erkek) kullanılmalıdır. Dişilerin, doğum yapmamış(nulipar) olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Eğer arada da hayvanların öldürülmesi planlanıyorsa, çalışma tamamlanmadan önce öldürülmesi planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır.

Doz seviyeleri ve maruz kalma sıklığı

Eş zamanlı kontrol grubuna ek olarak en az üç doz kullanılmalıdır. En yüksek doz tümör haricindeki etkilere bağlı olarak, normal yaşam süresini büyük ölçüde değiştirmeden, kilo almanın hafif baskılanması gibi çok az (%10'dan daha az) toksik etki oluşturmalıdır.

En düşük doz hayvanın normal gelişimine, büyümesine ve ömrüne etki etmemeli veya herhangi bir toksik belirti oluşturmamalıdır. Genelde, bu değer en yüksek dozun % 10'undan daha az olmamalıdır.

Ara doz(lar), yüksek ve düşük doz arasında oluşturulmalıdır.

Doz seviyelerinin seçiminde, önceki toksisite testlerinden ve çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alınmalıdır. Maruz kalma sıklığı normal şartlarda günlüktür. Eğer kimyasal, içme suyuyla veya besinle karıştırılarak veriliyorsa, bu sürekli olmalıdır.

Kontroller

Test maddesine maruz kalma dışında, uygulama gruplarına her hususta eşdeğer olan eş zamanlı bir kontrol grubu kullanılmalıdır.

Aerosolleri kapsayan ağız yoluyla ya da biyolojik aktivitesi karakterize edilmemiş emülsifiyerin kullanıldığı gibi özel durumlarda , taşıyıcıya maruz kalmayan ek bir kontrol grubu ayrıca kullanılmalıdır.

Uygulama yolu

Üç ana uygulama yolu oral(ağız yolu), dermal(deri yolu) ve inhalasyon(soluma yolu)'dur. Uygulama yolunun seçimi test maddesinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve insandaki benzer maruz kalma yoluna bağlıdır.

Oral yolla ilgili çalışmalar

Test maddesinin gastrointestinal (mide ve bağırsağa ait) yolla emildiği durumlarda ve ağız yolu insanların maruz kalabileceği yollardan biriyse, kontrendikasyon(belirli bir tedavinin uygun olmadığını ifade eden durum) olmadığı sürece uygulamanın oral yolla yapılması tercih edilir. Hayvanlar test maddesini besinle, içme suyunda çözünmüş olarak veya kapsül şeklinde alabilirler.

İdeal olarak haftada yedi gün günlük olarak doz uygulaması yapılır çünkü, haftada beş gün doz verilmesi, doz verilmeyen sürede toksik etkilerin iyileşmesine ya da yok olmasına neden olabilir ve sonuçları, son değerlendirmeyi etkileyebilir. Ancak, deneyimlere dayanarak, haftada beş gün doz uygulaması da kabul edilebilir.

Dermal yolla ilgili çalışmalar

Cilt lezyonlarının(doku bozulmaları) uyarılması için model sistem oluşturulması ve insandaki asıl maruz kalma yoluna benzemesi için cilt boyanarak kütanöz (cilde ait) yolla maruz kalma seçilebilir.

İnhalasyonla (soluma) ilgili çalışmalar

İnhalasyonla ilgili çalışmalar diğer uygulama yollarından daha karmaşık teknik problemler yarattığından, burada bu uygulama yoluyla ilgili detaylı bir rehber sunulmuştur. Özel durumlarda intratrakeal yolla uygulamanın geçerli bir alternatif oluşturacağı not edilmelidir.

Uzun süreli maruz kalmalar, genellikle planlanmış insan maruz kalmasına göre şekillendirilir, hayvanlara gerek günlük olarak odacığın dengeye ulaşmasından sonraki altı saat, haftanın beş günü (aralıklı maruz kalma) veya olası çevresel maruz kalma ile ilgili olarak haftada yedi gün, günde 22-24 saat (sürekli maruz kalma), yaklaşık olarak bir saat hayvanları günlük olarak besledikten sonra benzer zamanlarda ve odacığın içinde muamele yapılır. Her iki durumda da hayvanlar genellikle test maddesinin sabit konsantrasyonlarına maruz kalırlar.

Aralıklı ve sürekli maruz kalma arasındaki temel fark, ilkinde hayvanların günlük maruz kalmanın etkilerini iyileştirebilecekleri 17-18 saatlik, hatta hafta sonları için daha uzun bir süre olmasıdır.

Aralıklı veya sürekli maruz kalma seçimi çalışmanın amaçlarına ve benzerinin uygulanacağı insan maruz kalmasına bağlıdır. Ancak, belli teknik zorluklar göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, çevresel koşullar için sürekli maruz kalmanın avantajları, benzetimlemesi maruz kalma sırasındaki beslenme ve su içme ihtiyacıyla, uygulanabilir daha karmaşık aerosoll ve buhar ihtiyacıyla, izleme testleriyle dengelenebilir.

Maruz kalma odacıkları

Hayvanlar, yeterli oksijen içeriği ve eşit olarak dağılmış maruz kalma atmosferi temin etmek için saat başına en az 12 hava değişikliğinde dinamik hava akışı sağlamak amacıyla tasarlanmış soluma odacıklarında test edilmelidirler. Kontrol ve maruz kalma odacıklarının yapıları ve tasarımları, test maddesine maruz kalma dışındaki tüm hususlarda maruz kalma koşullarını karşılaştırılabilir kılmak için, eşdeğer olmalıdır. Test maddesinin etrafa akmasını engellemek amacıyla, genellikle, odacığın içinde hafif bir negatif basınç sağlanır. Odacıklar, test hayvanlarının sıkışmasını en aza indirmelidir. Genel bir kural olarak, odacığın atmosferinin kararlılığını sağlamak amacıyla test hayvanlarının toplam 'hacimleri' test odacığının hacminin % 5'ini geçmemelidir.

Ölçümler ve izlemeler aşağıdaki gibi olmalıdır:

(i) Hava akışı: Hava akışının odacık boyunca hızı tercihen sürekli izlenmelidir;.

(ii) Konsantrasyon: Günlük maruz kalma süresi boyunca test maddesinin konsantrayonu, ortalama değerin %±15'inden daha fazla değişkenlik göstermemelidir;Bu çalışmanın toplam süresi boyunca, günlük konsantrasyonların uygulanabildiği kadar sabit olması sağlanmalıdır.

(iii) Sıcaklık ve nem: kemirgenler söz konusuysa, test maddesini askıya almak için su kullanılan durumlar haricinde test atmosferinde sıcaklık 22 ±2 °C ve nem oranı da % 30 ve %70 arasında olmalıdır. Tercihen her ikisi de sürekli izlenmelidir;

(iv) Partikül büyüklüğü ölçümleri: partikül büyüklük dağılımı sıvı veya katı aerosol içeren bir odacık ortamında tayin edilmelidir. Aerosol partikülleri kullanılan deney hayvanlarının soluyabileceği büyüklükte olmalıdır. Oda atmosferinden alınan örnekler hayvanların soluk alma bölgesinde olmalıdır. Hava örneği, hayvanların maruz kaldığı parçacık dağılımını yansıtmalı ve gravimetrik temelde süspande tüm aerosolleri, hatta solunabilir olmayanları bile açıklamalıdır. Parçacık büyüklüğü analizleri, aerosolün kararlılığını sağlamak için ve sonrasında da maruz kalmalar sırasında gereken sıklıkta, hayvanların maruz kaldığı parçacık dağılımının tutarlılığını yeterli şekilde tayin etmek için çoğunlukla üretim sisteminin geliştirilmesi sırasında yürütülmelidir.

Çalışmanın süresi

Kanserojenite testinin süresi test hayvanlarının normal yaşam sürelerinin önemli bir kısmını içine alır. Testin sona erdirilme süresi fare ve hamster için 18 ay, sıçanlar için 24 ay olmalıdır ancak daha uzun yaşam süresine sahip ve/vey kendiliğinden tümör oluşturma oranı az olduğu bilinen belli hayvan suşları için, sonlandırma süresi fare ve hamster için 24 ay, sıçan için 30 ay olmalıdır. Alternatif olarak, böyle uzamış bir çalışmanın sonlandırılması kontrol veya en düşük doz grubundaki sağ kalan hayvanların sayısı % 25'e ulaştığı zaman kabul edilebilirdir. Cinsiyete bağlı farklı cevapların açık olduğu bir test sonlandırılırken her cinsiyet ayrı ayrı düşünülmelidir. Sadece yüksek doz grubundakilerin belirgin toksisite nedenleriyle zamanından önce öldüğü durumlarda toksik oluşumların diğer gruplarda problem yaratmaması sağlandığında bu durumun sonlandırmayı tetiklemesi söz konusu değildir. Negatif test sonuçlarının kabul edilebilir olması için, otoliz(hücrelerin, enzimler sayesinde kendi kendine parçalanması), yamyamlık veya yönetim problemlerine bağlı olarak herhangi bir grubun % 10'dan fazla kaybı olmamalı ve fare ve hamster için 18 ayda, sıçan için 24 ayda sağ kalımları tüm gruplarda % 50'den az olmamalıdır.

İşlem

Gözlemler

Kafeslerin günlük olarak gözlenmelerine deri ve tüylerdeki, gözlerdeki, mukoz zardaki değişiklerin yanında, solunum, dolaşım, otonomik ve merkezi sinir sistemi, somatomotor(alt motor) etkinlik ve davranış durumları dahildir.

Hayvanların düzenli olarak gözlenmeleri, hayvanların çalışmada yamyamlık, dokuların otolizi veya yanlış yerleştirilme nedeniyle kayıplarının olmamasının sağlanabilmesi için gereklidir. Ölmek üzere olan hayvanlar fark edildiğinde uzaklaştırılmalı ve hayvanlara nekroskopi(kapsamlı otopsi) yapılmalıdır.

Klinik belirtiler ve mortalite (ölüm oranı) tüm hayvanlar için kaydedilmelidir. Tümör gelişimine özel önem verilmelidir: her bir gözle görünür büyüklükteki veya dokunma ile anlaşılan tümörlerin ortaya çıkma zamanı; yeri, boyutları, görünüşü ve ilerlemesi kaydedilmelidir.

Gıda tüketimi ölçümleri (ve madde içme suyuyla uygulanmışsa su tüketimi ölçümleri,) hayvanların sağlık durumu veya vücut ağırlığı değişiklikleri başka türlüsünün uygulanması gerektiğine işaret etmediği sürece çalışmanın 13 haftası boyunca haftalık olarak, sonrasında da yaklaşık üç aylık aralıklarla yapılmalıdır. Vücut ağırlıkları tüm hayvanlar için ayrı ayrı test süresinin ilk 13 haftasında haftada bir defa ve daha sonra da her dört haftada bir en az bir defa kaydedilmelidir.

Klinik incelemeler (muayeneler)
Hematoloji

Çalışma sırasında hayvanın sağlığında bozulma gözlenirse, etkilenen hayvanların ayırıcı kan sayımları yapılmalıdır.

12. ve 18. aylarda ve gözden çıkarılmalarından önce hayvanlardan mikroskopta incelemek için kansmear (doku) örnekleri alınmalıdır. Yüksek doz grubu ve kontrol hayvanlarından alınan örneklerde ayırıcı kan sayımı yapılmalıdır. Eğer bu veriler, özellikle de gözden çıkarılmalardan önce elde edilenler, veya patolojik incelemelerden elde edilen veriler ihtiyaç duyulduğuna işaret ediyorsa, ayırıcı kan sayımı bir sonraki düşük doz grubu/grupları için de yapılmalıdır.

Nekroskopi (kapsamlı otopsi)

Çalışmadaki deney sırasında ölenler ve ölmek üzere olup öldürülenler de dahil bütün hayvanlara tam teşekküllü nekroskopi yapılmalıdır. Tüm büyük ve gözlenebilen tümör veya doku bozulmaları veya tümör şüphesi olan doku bozulmaları muhafaza edilmelidir.

Aşağıdaki organ ve dokular kararlı bir ortamda daha sonraki histopatolojik incelemeler için muhafaza edilmelidir: beyin (ilik/dokular arası köprüler, beyincik zarı(serebellar korteks), beyin zarı(serebral korteks) kesitleri dahildir), hipofiz tiroit (paratiroit dahil), timus doku, akciğerler ve trake, kalp, aort, tükrük bezleri, karaciğer, dalak, böbrekler, adrenaller, pankreas, yumurtalıklar, uterus, yardımcı cinsiyet organları, deri, özofagus, mide, on iki parmak bağırsağı(duodenum), ince bağırsak(jejunum),ince bağırsağın son bölümü(ileum), kör bağırsak(caceum), kolon, rektum, idrar torbası, lenf nodülleri, dişi meme bezleri, uyluk kasları, periferal sinir, kalça kemiği (eklem dahil), göğüs kemiği kemik iliği, üç seviyede omurilik (boyna ait(servikal), göğse ait(toraks), bele ait(lumbar)) ve gözler.

Akciğerlerin şişirilmesi ve idrar kesesinin sabitleyiciyle muamele edilmesi bu dokuları muhafaza etmek için en iyi yoldur: solunum çalışmalarında akciğerlerin şişirilmesi uygun histopatolojik inceleme için önemlidir. Solunum çalışmaları gibi özel çalışmalarda burun, yutak ve gırtlak dahil tüm soluk alıp verme yolu muhafaza edilmelidir

Histopatoloji

(a) Test sırasında ölen veya gözden çıkarılan hayvanların organ ve dokularında ve kontrol ve yüksek doz grubundaki hayvanlara tam histopatolojik inceleme yapılmalıdır;

(b) Herhangi bir organdaki bütün büyük gözle görülebilir tümörler veya tümör şüphesi olan doku bozulmaları mikroskop altında incelenmelidir.

(c) Yüksek doz ve kontrol gruplarında neoplastik doku bozulmalarının görülüş sıklığında belirgin bir değişiklik varsa, diğer gruplardaki ilgili organ veya dokularda histopatolojik inceleme yapılmalıdır.

(ç) Eğer yüksek doz gruplarındaki hayatta kalmalar, kontrol grubundakilerden çok daha az ise bir sonraki daha düşük doz grubu detaylı olarak incelenmelidir.

(d) Yüksek doz grubunda toksik veya diğer etkilerin tetiklendiğine dair belirtiler varsa, bu durum neoplastik yanıtı etkiler, bir sonraki daha düşük doz grubu detaylı olarak incelenmelidir.

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu için, testin başlangıcındaki hayvan sayısını, test sırasında tümör oluşumu gözlenen hayvan sayısını ve gözden çıkarılmayı takiben tümör bulunan hayvan sayısını gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Gözlenen tüm sonuçlar uygun bir istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Geçerli herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- Türler, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli;
- test koşulları;
  Maruz kalma düzeneğinin tarifi: tasarım, tip, boyutlar, hava kaynağı, parçacık ve aerosol üreten sistem, havalandırma yöntemi, egzos havasının muamele edilmesi ve hayvanların test odacığında barınma yöntemi. Sıcaklık, nem ve uygun durumlarda aerosol konsantrasyonunun veya parçacık büyüklüğünün kararlılığını ölçme ekipmanı tarif edilmelidir.

  Maruz kalma verileri: çizelge haline getirilmeli ve ortalama değerler, değişkenlik ölçümü (ör. standart sapma) ve aşağıda belirtilenler dahil edilmelidir:

  (a) Soluma düzeneğindeki hava akış hızları
  (b) Havanın nemi ve sıcaklığı;
  (c) yazılı konsantrasyonlar (test maddesinin toplam miktarı, havanın hacmiyle bölünmüş solunum düzeneğine yedirilir.)
  (d) taşıyıcının yapısı, eğer kullanıldıysa;
  (e) test solunum bölgesindeki mevcut konsantrasyon
  (f) ortada bulunan parçacık büyüklüğü (uygun yerlerde),
- doz seviyeleri (kullanıldıysa, taşıyıcınınki de dahil)ve konsantrasyon değerleri;
- cinsiyete, doza ve tümör tipine bağlı tümör insidansı(sıklığı) verileri,

- çalışma sırasındaki ölümlerin zamanı veya hayvanların çalışma bitinceye kadar sağkalıp kalmadıkları;
- cinsiyete ve doza bağlı toksik cevap,
- cinsiyete ve doza bağlı toksisite etkileri verileri,
- toksik etkiler ve diğer etkilerin tanımlamaları;
- her bir anormal belirtinin gözlendiği zaman ve sonraki seyri;
- gıda ve vücut ağırlığı verileri;
- uygulanan hematolojik testleri ve tüm sonuçlar,
- nekroskopi(otopsi) bulguları;
- histopatolojik bulgularla ilgili detaylı bilgiler,
- uygun yerlerde sonuçların istatistiksel uygulaması;
- sonuçların tartışılması.;
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

B.33 BİRLEŞTİRİLMİŞ KRONİK TOKSİSİTE/KANSEROJENİTE TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Birleştirilmiş kronik toksisite kanserojenite testinin amacı bir maddenin uzatılan maruz kalmayı takiben memeli türlerindeki kronik ve kanserojenik etkilerini belirlemektir.

Bu amaçla kanserojenite testi en az bir muamele uydu grubu ve kontrol uydu grubuyla bütünlenir. Yüksek doz uydu grubu için kullanılan doz, kanserojenite testindeki yüksek doz grubundan daha fazla olabilir. Kanserojenite testindeki hayvanlar, kanserojenik cevap yanında genel toksisite için de incelenirler. Muamele edilen uydu grubundaki hayvanlar genel toksisite için incelenirler.

Test maddesi, normalde çeşitli gruplardaki deney hayvanlarına, grup başına tek doz olacak şekilde haftanın yedi günü uygun bir yolla, yaşam sürelerinin önemli bir kısmında uygulanır. Test maddesine maruz kalma sırasında ve sonrasında, deney hayvanları toksisite belirtilerine ve tümör gelişmesine karşı günlük olarak gözlenirler.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hayvanlar testten en az beş gün öncesinden, deneysel beslenme ve barınma koşulları altında tutulurlar. Testten önce sağlıklı ve genç hayvanlar rastgele kontrol ve uygulama gruplarına ayrılırlar.

Deney hayvanları

Tercih edilen tür sıçandır. Daha önceki çalışma sonuçlarına dayanılarak diğer türler (kemirgen veya kemirgen olmayan) kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan genç sağlıklı laboratuar suşlarına uygulama yapılır ve doz uygulaması mümkün olduğunca sütten kesildikten hemen sonra başlamalıdır.

Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cinsiyet için de, uygun ortalama değerin % 20'sini geçmemelidir. Subkronik bir solunum çalışması uzun süreli bir çalışmanın ön çalışması olarak yürütüldüğü zaman her iki çalışmada da aynı tür ve ırk kullanılmalıdır.

Sayı ve cinsiyet

Kemirgenlerde her bir doz ve eş zamanlı kontrol grubu için en az 100 hayvan (50 dişi ve 50 erkek) kullanılmalıdır. Dişilerin, doğum yapmamış (nulipar) olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Eğer arada da hayvanların öldürülmesi planlanıyorsa, çalışma tamamlanmadan önce öldürülmesi planlanan hayvan sayısı artırılmalıdır.

Tümör haricindeki patoloji değerlendirmeleri için uydu kontrol grupları cinsiyet başına 10 hayvan içerirken, muamele edilen uydu grup(lar) her bir cinsiyet için en az 20 hayvan içermelidir.

Doz ve maruz kalma sıklığı

Kanserojenite test uygulamaları için eş zamanlı kontrol grubuna ek olarak en az üç doz kullanılmalıdır. En yüksek doz tümör haricindeki etkilere bağlı olarak, normal yaşam süresini büyük ölçüde değiştirmeden, kilo almanın hafif baskılanması gibi çok az (%10'dan daha az) toksik etki oluşturmalıdır.

En düşük doz hayvanın normal gelişimine, büyümesine ve ömrüne etki etmemeli veya herhangi bir toksisite belirtisi oluşturmamalıdır. Genelde, bu değer en yüksek dozun % 10'undan daha az olmamalıdır.

Ara doz(lar), yüksek ve düşük doz arasında orta seviyede oluşturulmalıdır.

Doz seviyelerinin seçiminde, önceki toksisite testlerinden ve çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alınmalıdır.

Kronik toksisite test uygulama grupları için, muamele edilmiş ilave gruplar ve eş zamanlı bir kontrol uydu grubu testte yer almalıdır. Muamele edilen uydu grubundaki hayvanlar en yüksek dozda belirgin toksisite belirtileri göstermelidirler.

Maruz kalma sıklığı normal şartlarda günlüktür. Eğer kimyasal, içme suyuyla veya besinle karıştırılarak veriliyorsa, bu sürekli olmalıdır.

Kontroller

Test maddesine maruz kalma dışında, uygulama gruplarına her hususta eşdeğer olan eş zamanlı bir kontrol grubu kullanılmalıdır.

Aerosolleri kapsayan ağız yoluyla ya da biyolojik aktivitesi karakterize edilmemiş emülsifiyerin kullanıldığı gibi özel durumlarda , taşıyıcıya maruz kalmayan ek bir kontrol grubu ayrıca kullanılmalıdır.

Uygulama yolu

Üç ana uygulama yolu. oral(ağız yolu), dermal(deri yolu) ve inhalasyon(soluma yolu)'dur Uygulama yolunun seçimi test maddesinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve insanlardaki benzer maruz kalma yoluna bağlıdır.

Oral yolla ilgili çalışmalar

Test maddesinin gastrointestinal yolla emildiği durumlarda ve yutma yolu insanların maruz kalabileceği yollardan biriyse, kontrendikasyon olmadığı sürece uygulamanın oral yolla yapılması tercih edilir. Hayvanlar test maddesini besinle, içme suyunda çözünmüş olarak veya kapsül şeklinde alabilirler. İdeal olarak haftada yedi gün günlük olarak doz uygulaması yapılır çünkü haftada beş gün doz verilmesi, doz verilmeyen sürede toksik etkilerin iyileşmesine ya da yok olmasına neden olabilir ve sonuçları, son değerlendirmeyi etkileyebilir. Ancak, pratik düşüncelere dayanarak haftada beş gün doz uygulamasının da kabul edilebilir olduğu düşünülmektedir.

Dermal yolla ilgili çalışmalar

Cilt lezyonlarınıntetiklenmesiiçin model sistem oluşturulması ve insandaki asıl maruz kalma yoluna benzemesi için, cilt boyanarak cilde ait maruz kalma seçilebilir.

İnhalasyonla (solunumla) ilgili çalışmalar

İnhalasyonla ilgili çalışmalar diğer uygulama yollarından daha karmaşık teknik problemler yarattığından, burada bu uygulama yoluyla ilgili detaylı bir rehber sunulmuştur. Özel durumlarda trake içi damlatmanın (damla damla akıtma) geçerli bir alternatif oluşturacağı not edilmelidir.

Uzun süreli maruz kalmalar genellikle planlanmış insan maruz kalımına göre şekillendirilir, hayvanlara gerek günlük olarak odacığın dengeye ulaşmasından sonraki altı saat, haftanın beş günü (aralıklı maruz kalma) veya olası çevresel maruz kalma ile ilgili olarak haftada yedi gün, günde 22-24 saat (sürekli maruz kalma), yaklaşık olarak bir saat hayvanları günlük olarak besledikten sonra benzer zamanlarda ve odacığın içinde muamele yapılır. Her iki durumda da hayvanlar genellikle test maddesinin sabit konsantrasyonlarına maruz kalırlar.

Aralıklı ve sürekli maruz kalma arasındaki temel fark, ilkinde hayvanların günlük maruz kalmasınınetkilerini iyileştirebilecekleri 17-18 saatlik, hatta hafta sonları için daha uzun bir süreye sahip olmalarıdır.

Aralıklı veya sürekli maruz kalma seçimi çalışmanın amaçlarına ve benzerinin uygulanacağı insan maruz kalmasına bağlıdır. Ancak, belli teknik zorluklar göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, çevresel koşullar için sürekli maruz kalmanın avantajları, maruz kalma sırasındaki beslenme ve su içme ihtiyacıyla, uygulanabilir daha karmaşık aerosol ve buhar ihtiyacıyla, izleme testleriyle dengelenebilir.

Maruz kalma odacıkları

Hayvanlar, yeterli oksijen içeriği ve eşit olarak dağılmış maruz kalma atmosferi temin etmek için saat başına en az 12 hava değişikliğinde dinamik hava akışı sağlamak amacıyla

tasarlanmış soluma odacıklarında test edilmelidirler. Kontrol ve maruz kalma odacıklarının yapıları ve tasarımları, test maddesine maruz kalma dışındaki tüm hususlarda maruz kalma koşullarını karşılaştırılabilir kılmak için, eşdeğer olmalıdır. Test maddesinin etrafa akmasını engellemek amacıyla, genellikle, odacığın içinde hafif bir negatif basınç sağlanır. Odacıklar, test hayvanlarının sıkışmasını en aza indirmelidir. Genel bir kural olarak, odacığın atmosferinin kararlılığını sağlamak amacıyla test hayvanlarının toplam 'hacimleri' test odacığının hacminin % 5'ini geçmemelidir.

Ölçümler ve izlemeler aşağıdaki gibi olmalıdır:

(i) Hava akışı: Hava akışının odacık boyunca hızı tercihen sürekli izlenmelidir.

(ii)Konsantrasyon: Günlük maruz kalma süresi boyunca test maddesinin konsantrasyonu, ortalama değerin +/- %15'inden daha fazla değişkenlik göstermemelidir. Bu çalışmanın toplam süresi boyunca, günlük konsantrasyonların uygulanabildiği kadar sabit olması sağlanmalıdır.

(iii) Sıcaklık ve nem: kemirgenler söz kunusuysa, test maddesini askıda bırakmak için su kullanılan durumlar haricinde test atmosferinde sıcaklık 22 ± 2 °C derece ve nem oranı da % 30 ve %70 arasında olmalıdır. Tercihen her ikisi de sürekli izlenmelidir.

iv) Parçacık büyüklüğü ölçümleri: parçacık büyüklük dağılımı sıvı veya katı aerosol içeren bir odacık ortamında tayin edilmelidir. Aerosol partikülleri kullanılan deney hayvanlarının soluyabileceği büyüklükte olmalıdır. Oda atmosferinden alınan örnekler hayvanların soluk alma bölgesinde olmalıdır. Hava örneği, hayvanların maruz kaldığı parçacık dağılımını yansıtmalı ve gravimetrik temelde askıda kalan tüm aerosolleri, hatta solunabilir olmayanları bile açıklamalıdır. Parçacık büyüklüğü analizleri, aerosolün kararlılığını sağlamak için ve sonrasında da maruz kalmalar sırasında gereken sıklıkta, hayvanların maruz kaldığı parçacık dağılımının tutarlılığını yeterli şekilde tayin etmek için. Çoğunlukla üretim sisteminin geliştirilmesi sırasında yürütülmelidir.

Çalışmanın süresi

Kanserojenite testinin süresi test hayvanlarının normal yaşam sürelerinin önemli bir kısmını içine alır. Testin sona erdirilme süresi fare ve hamster için 18 ay, sıçanlar için 24 ay olmalıdır ancak daha uzun yaşam süresine sahip ve/veya kendiliğinden tümör oluşturma oranı az olduğu bilinen belli hayvan suşları için, sonlandırma süresi fare ve hamster için 24 ay, sıçan için 30 ay olmalıdır. Alternatif olarak, böyle uzamış bir çalışmanın sonlandırılması kontrol veya en düşük doz grubundaki sağ kalan hayvanların sayısı % 25'e ulaştığı zaman kabul edilebilirdir. Cinsiyete bağlı farklı cevapların açık olduğu bir test sonlandırılırken her cinsiyet ayrı ayrı düşünülmelidir. Sadece yüksek doz grubundakilerin belirgin toksisite nedenleriyle zamanından önce öldüğü durumlarda, toksik oluşumların diğer gruplarda problem yaratmaması sağlandığında, bu durumun sonlandırmayı tetiklemesi söz konusu değildir. Negatif test sonuçlarının kabul edilebilir olması için, otoliz (hücrelerin, enzimler sayesinde kendi kendine parçalanması), yamyamlık veya yönetim problemlerine bağlı olarak herhangi bir grubun % 10'dan fazla kaybı olmamalı ve fare ve hamster için 18 ayda, sıçan için 24 ayda sağ kalımları tüm gruplarda % 50'den az olmamalıdır.

Her bir cinsiyet için doz uygulanan 20 hayvandan ve cinsiyet başına ilişkili 10 kontrol hayvanından oluşan, kronik toksisite testlerinin uygulanması için kullanıl an bir uydu grup

testte en az 12 ay bulunmalıdır. Bu hayvanların gerontolojik (ihtiyarlıkla ilgili) değişikliklerle karmaşık hale gelmemiş test maddesiyle ilgili patoloji incelemesi için gözden çıkarılma planları yapılmalıdır.

İşlem

Gözlemler

Kafeslerin günlük olarak gözlenmelerine deri ve tüylerdeki, gözlerdeki, mukoz zardaki değişiklerin yanında, solunum, dolaşım, otonomik ve merkezi sinir sistemi, alt motor(somamotor) aktivite ve davranış durumları dâhildir.

Muamele edilen uydu gruptaki hayvanların uygun aralıklarla klinik muayeneleri yapılmalıdır. Hayvanların düzenli olarak gözlenmeleri, hayvanların çalışmada yamyamlık, dokuların otolizi veya yanlış yerleştirilme nedeniyle kayıplarının olmamasının sağlanabilmesi için gereklidir. Ölmek üzere olan hayvanlar fark edildiğinde uzaklaştırılmalı ve hayvanlara otopsi yapılmalıdır.

Nörolojik ve oküler değişiklikler, ölüm oranı dâhil tüm klinik belirtiler tüm hayvanlar için kaydedilmelidir. Tümör gelişimine özel önem verilmelidir: her bir gözle görünür büyüklükteki veya açıkça görülebilen tümörlerin ortaya çıkma zamanı; yeri, boyutları, görünüşü ve ilerlemesi kaydedilmelidir.

Gıda tüketimi ölçümleri (ve madde içme suyuyla uygulanmışsa su tüketimi ölçümleri,) hayvanların sağlık durumu veya vücut ağırlığı değişiklikleri başka türlüsünün uygulanması gerektiğine işaret etmediği sürece çalışmanın 13 haftası boyunca haftalık olarak, sonrasında da yaklaşık üç aylık aralıklarla yapılmalıdır. Vücut ağırlıkları tüm hayvanlar için ayrı ayrı test süresinin ilk 13 haftasında haftada bir defa ve daha sonra da her dört haftada bir en az bir defa kaydedilmelidir.

Klinik incelemeler (muayeneler)

Hematoloji

Hematolojik inceleme (ör. Hemoglobin içeriği; toplam hücre hacmi, toplam kırmızı kan hücresi, toplam beyaz kan hücresi, trombositler veya pıhtılaşma potansiyelinin diğer ölçümleri) üçüncü ayda, altıncı ayda ve sonrasında da yaklaşık altı aylık aralıklarla ve deney sonlandırılmadan önce yapılmalıdır. İncelemeler kemirgen olmayan hayvanlardan ve 10 sıçan/cinsiyet şeklinde tüm gruplardan alınan kan örneklerinde yapılır. Eğer mümkünse, örnekler her aralıkta aynı sıçanlardan alınmalıdır.

Eğer kafesteki gözlemler çalışma sırasında hayvanın sağlığında bozulma olduğu işaret ederse, etkilenen hayvanların ayırıcı kan sayımları yapılmalıdır.

Ayırıcı kan sayımı en yüksek doz grubundaki hayvanlarla ve kontrol hayvanlarından alınan örneklerde yapılır. Ayırt edici kan sayımı bir sonraki düşük doz grubu(grupları) için sadece en yüksek grup ve kontrol arasında büyük bir tutarsızlık varsa veya böyle bir durum patolojik bulgularla gösteriliyorsa yapılır.

İdrar analizi

İdrar örnekleri tüm kemirgen olmayan hayvanlardan ve 10 sıçan/cinsiyet şeklinde tüm gruplardan, eğer mümkünse, hematolojik incelemede olduğu gibi aynı aralıktaki aynı sıçanlardan analiz için toplanmalıdır. Aşağıdaki incelemeler her bir hayvan için ayrı ayrı ya da kemirgenler için bir araya getirilen örnek/cinsiyet/gruplarda yapılır:

-görünüş: her bir hayvan için ayrı ayrı hacim ve yoğunluk,
-protein, glukoz, keton, gizli kan (yarı-nicel),
-sediment mikroskopisi (yarı-nicel).

Klinik kimya

Yaklaşık altı aylık aralıklarla ve testin sonunda, kan örnekleri klinik biyokimya incelemeleri için tüm kemirgen olmayan hayvan gruplarından ve 10sıçan/cinsiyet olacak şekilde, eğer mümkünse, her aralıkta aynı sıçanlardan alınır. Ek olarak, kemirgen haricindeki hayvanlardan ön hazırlık için de numune alınmalıdır.

Plazma bu örneklerden hazırlanır ve aşağıdaki tayinler yapılır:
-toplam protein konsantrasyon,
-albumin konsantrasyon,
-karaciğer fonksiyon testleri (alkalin fosfataz etkinliği, glutamik piruvik transaminaz [1] etkinliği ve glutamik okzaloasetik transaminaz[2] etkinliği), gamma glutamil transpeptidaz, ornitin dekarboksilaz,
-açlık kan şekeri gibi karbonhidrat metabolizması,
-kan üre azotu gibi böbrek fonksiyon testleri.

Nekroskopi (kapsamlı otopsi)

Çalışmadaki deney sırasında ölenler ve ölmek üzere olup öldürülenler de dâhil bütün hayvanlara tam teşekküllü nekroskopi yapılmalıdır. Hayvanların gözden çıkarılmalarından önce, ayırıcı kan sayımı için tüm hayvanlardan kan örnekleri toplanmalıdır. Bütün büyük görülebilen doku bozulmaları, tümörler veya tümör şüphesi olan doku bozulmaları muhafaza edilmelidir. Büyük ölçekteki gözlemlerle mikroskobik bulgular arasında ilişki sağlanmasına çalışılmalıdır.

Tüm organ ve dokular histopatolojik inceleme için muhafaza edilmelidirler. İncelenen doku ve organlar aşağıdaki gibidir: beyin [(3)] (ilik/dokular arası köprüler, beyincik zarı(serebellar korteks), beyin zarı(serebral corteks)), hipofiz tiroit (paratiroit dahil), timus doku, akciğerler (trake dahil), kalp, aort, tükrük bezleri, karaciğer [(1)], dalak, böbrekler [(1)], adrenaller [(1)], özofagus, mide, oniki parmak bağırsağı(duodenum), ince bağırsak(jejunum), ince bağırsağın son bölümü(ileum), kör bağırsak (caecum), kolon, rektum, uterus, idrar kesesi, lenf nodülleri, pankreas, yumurtalıklar [(1)], yardımcı cinsiyet organları, dişi meme bezleri, deri, kas sistemi, periferal, sinir, spinal cord (boyna ait(servikal),göğse ait(toraks), bele ait(lumbar)), kemik iliği ve kalça kemiği,göğüs kemiği (eklem dahil) ve gözler.

---

[1] serum alanin aminotransferaz olarak bilinir.
[2] serum aspartat aminotransferaz olarak bilinir.
3 kemirgen grupları için cinsiyet başınan 10 hayvandan alınan bu organlar tartılmalıdır.

Akciğerlerin şişirilmesi ve idrar kesesinin sabitleyiciyle muamele edilmesi bu dokuları muhafaza etmek için en iyi yoldur; solunum çalışmalarında akciğerlerin şişirilmesi uygun histopatolojik inceleme için önemlidir. Solunum çalışmaları gibi özel çalışmalarda burun, yutak ve gırtlak dahil tüm soluk alıp verme yolu muhafaza edilmelidir.
Diğer klinik incelemeler yapıldığı takdirde, bu işlemlerden elde edilecek bilgiler mikroskobik incelemelerden önce elde mevcut olmalıdır çünkü bu bilgiler patologlar için anlamlı bir rehber olabilir.

Histopatoloji

Kronik toksisite test uygulamaları için:
Yüksek doz uydu grubu ve kontrol grubundaki tüm hayvanların muhafaza edilen tüm organlarına detaylı inceleme yapılmalıdır. Yüksek doz uydu grubunda test maddesine bağlı patolojiye rastlanırsa, diğer uydu gruplarındaki tüm hayvanların hedef organları tam ve detaylı bir histopatolojik incelemeye tabi tutulmalıdır. Bunu yanında, aynı şekilde kanserojenite testi uygulama kısmındaki muamele gruplarının hedef organları da çalışmanın sonunda incelenmelidir.

Kanserojenite testi uygulama kısmı için:

(a) Test sırasında ölen veya gözden çıkarılan hayvanların organ ve dokularında ve kontrol ve yüksek doz grubundaki hayvanlara tam histopatolojik inceleme yapılmalıdır;

(b) Herhangi bir organdaki bütün büyük gözle görülebilir tümörler veya tümör şüphesi olan doku bozulmaları mikroskop altında incelenmelidir.

(c) Yüksek doz ve kontrol gruplarında neoplastik doku bozulmalarının görülüş sıklığı anlamlı bir değişiklik varsa, diğer ve gruplardaki ilgili organ veya dokularda histopatolojik inceleme yapılmalıdır.

(d) Eğer yüksek doz gruplarındaki hayatta kalmalar, kontrol grubundakilerden daha azsa o zaman bir sonraki daha düşük doz grubu detaylı olarak incelenmelidir;

(e) Yüksek doz grubunda toksik veya diğer etkilerin uyarıldığına dair belirtiler varsa, bu durum neoplastik cevabı etkiler, bir sonraki daha düşük doz grubu detaylı olarak incelenmelidir;

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu için, testin başlangıcındaki hayvan sayısını, test sırasında tümör oluşumu veya toksik etki gözlenen hayvan sayısını ve gözlenme zamanını, gözden çıkarılmayı takiben tümör bulunan hayvan sayısını gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Gözlenen tüm sonuçlar uygun bir istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Bilinen herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, mümkünse, aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- Türler, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli;
- test koşulları;

Maruz kalma düzeneğinin tarifi: tasarım, tip, boyutlar, hava kaynağı, parçacık ve aerosol üreten sistem, havalandırma yöntemi, ekzos havasının muamele edilmesi ve hayvanların test odacığında barınma yöntemi. Sıcaklık, nem ve uygun durumlarda aerosol konsantrasyonun veya parçacık büyüklüğünün kararlılığını ölçme ekipmanı tarif edilmedilir.

Maruz kalma verileri: çizelge haline getirilmeli ve ortalama değerler , değişkenlik ölçümü (ör. standart sapma) ve aşağıda belirtilenler dahil edilmelidir:
(a) soluma düzeneğindeki hava akış hızları
(b) havanın nemi ve sıcaklığı;
(c) yazılı konsantrasyonlar (test maddesinin toplam miktarı, havanın hacmiyle bölünmüş solunum düzeneğine yedirilir.)
(d) taşıyıcının yapısı, eğer kullanıldıysa;
(e) test solunum bölgesindeki mevcut konsantrasyon
(f) medyan parçacık büyüklüğü (uygun yerlerde),
- doz seviyeleri (kullanıldıysa, taşıyıcınınki de dahil)ve konsantrasyon değerleri;
- cinsiyete, doza ve tümör tipine bağlı tümör insidansı(sıklığı) verileri,
- çalışma sırasındaki ölümlerin zamanı veya hayvanların çalışma bitinceye kadar sağ kalıp kalmadıkları;uydu grupları dahil,
- cinsiyete ve doza bağlı toksik etkileri verileri,
- toksik etkiler ve diğer etkilerin tanımlamaları;
- her bir anormal belirtinin gözlendiği zaman ve sonraki seyri;
- gıda ve vücut ağırlığı verileri;
- oftalmolojik(göz ve göz hastalıklarıyla ilgili) bulgular,
- uygulanan hematolojik testler ve tüm sonuçları,
- uygulanan klinik biyokimya testleri ve tüm sonuçlar (herhangi bir üriner analiz dahil),
- nekroskopi(otopsi) bulguları;
- histopatolojik bulgularla ilgili detaylı bilgiler,
- uygun yerlerde sonuçların istatistiksel uygulaması;
- sonuçların tartışılması.
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

B. 34. TEK NESİLLİ ÜREME TOKSİSİTESİ TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi kademeli dozlarda dişi ve erkeklerin bulunduğu çeşitli gruplara uygulanır. Erkekler büyümeleri süresince ve en az bir tam sperm oluşması döngüsü boyunca, test maddesinin sperm oluşması işlemi üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya çıkarmak için (farelerde yaklaşık 56 gün, sıçanlarda 70 gün) doza maruz kalmalıdırlar.

Anne babadan oluşan (P) neslin dişileri en az iki tam cinsellik aktivitesi durumu döngüsü boyunca test maddesinin cinsellik aktivitesi durumu üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya çıkarmak için doza maruz kalmalıdırlar, Hayvanlar daha sonra çiftleştirilir. Test maddesi her iki cinsiyete de çiftleşme süresi boyunca uygulanır ve daha sonra sadece dişilere hamilelik ve emzirme süresi boyunca uygulanmaya devam edilir.

Solunum yoluyla yapılan uygulamalarda yöntemin değişikliği gerekecektir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Testten önce sağlıklı genç yetişkin hayvanlar rastgele seçilir ve uygulama ve kontrol gruplarına ayrılırlar. Hayvanlar testin uygulanmasından önce en az beş gün deneysel barınma ve beslenme koşullarında tutulurlar.

Test maddesinin diyet veya içme suyuyla uygulanması tavsiye edilir. Diğer uygulama yolları da ayrıca kabul edilebilir. Bütün hayvanlara uygun deneysel süreç boyunca aynı yöntemle doz verilmelidir. Doz uygulanmasını kolaylaştırmak için taşıyıcı veya başka bir katkı maddesi kullanılmışsa, bunların toksik etki oluşturmadığı bilinmesi gerekir.
Doz uygulanması haftada yedi gün şeklinde olmalıdır.

Deney hayvanları

Türlerin seçimi

Sıçan veya fare tercih edilen türlerdir. Önceden deneysel işlemlere maruz bırakılmamış sağlıklı hayvanlar kullanılmalıdır. Doğurganlığı az olan suşlar kullanılmamalıdır. Test hayvanları tür, ırk, cinsiyet, ağırlık ve/veya yaşa göre tanımlanmalıdır.
Doğurganlıkla ilgili makul bir değerlendirme yapabilmek için, hem erkek hem de dişilerle çalışılmalıdır. Tüm test ve kontrol hayvanları doz uygulanmasına başlamadan önce memeden kesilmelidir.

Sayı ve cinsiyet

Her bir muamele ve kontrol grubu yeterli sayıda yaklaşık 20 hamile dişi olacak şekilde hayvan içermelidir.
Amaç maddenin P nesli hayvanlarında doğurganlık, hamilelik ve anaç davranışlar üzerindeki potansiyelini ve gebeliğin başlamasından emzirmenin sonlanmasına kadar F1 dölü üzerindeki potansiyelini anlamlı şekilde değerlendirmek için yeterli sayıda hamilelik ve döl meydana getirmektir.

Test koşulları

Gıda ve içecek istenildiği kadar sağlanmalıdır. Doğuma yakın hamile dişiler ayrı ayrı gebelik ve doğum kafeslerine yerleştirilmelidirler ve yuva yapmak için gerekli malzemeler sağlanmalıdır.

Doz seviyeleri

En az üç muamele grubu ve bir kontrol grubu kullanılmalıdır. Eğer test maddesi uygulanırken bir taşıyıcı kullanılmışsa, kontrol grubu taşıyıcıyı kullanılan en yüksek hacimde almalıdır. Eğer test maddesi diyetle uygulanır veya kullanımının azalmasına neden olursa, sonrasında çift-beslenme kontrol grubunun kullanılmasının gerekli olduğu düşünülebilir. İdeal olarak, test maddesinin fiziksel/kimyasal doğası veya biyolojik etkileriyle sınırlanmadıkça, en yüksek doz toksisiteyi indüklemeli fakat parental (P) (ana-babaya ait) hayvanlarda ölüme (mortalite) neden olmamalıdır. Ara doz(lar) test maddesinin oluşturduğu en az seviyedeki toksisite etkileri neden olmalıdır ve düşük doz anne-baba veya döllerde herhangi bir gözlenebilir olumsuz etkiye neden olmamalıdır.Sonda veya kapsülle uygulandığında her bir hayvana verilen dozajlar her bir hayvanın ayrı ayrı vücut ağırlığına bağlı olmalı ve vücut ağırlığındaki değişikliklere göre haftalık olarak ayarlanmalıdır. Hamilelik boyunca dişiler için, eğer istenirse, dozajlar hamileliğin 0 ve 6. günlerindeki vücut ağırlığına dayanmalıdır.

Sınır testi

Düşük toksisiteye sahip maddeler söz konusu olduğunda, en az 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün'e eşdeğer doz, üreme performansıyla etkileşimi olduğuna dair herhangi bir iz bırakmazsa, diğer doz seviyeleriyle ilgili çalışmaların gerekli olmadığı düşünülebilir. Eğer yüksek doz seviyeleriyle ilgili başlangıç çalışmaları maternal toksisiteyle ilgili kesin kanıtlar meydana getiriyor fakat üreme üzerinde hiçbir olumsuz etki yaratmıyorsa, diğer doz seviyeleriyle ilgili çalışmaların gerekli olmadığı düşünülebilir.

Testin performansı

Deneysel program

Parental (P) erkeklerin günlük doz uygulamaları yaklaşık beş-dokuz haftalıkken başlamalıdır. Bu süre zarfında hayvanlar sütten kesilmiş olmalı ve en az beş gün ortama alıştırılmalıdırlar. Sıçanlarda doz uygulaması çiftleşme döneminden önceki 10 hafta devam eder (fare için bu sekiz haftadır). Erkekler çiftleşme süresinin sonunda öldürülmeli ve incelenmelidir veya alternatif olarak, ikinci bir yavrunun meydana gelmesi olasılığına karşın testte tutulabilirler ve çalışma sonlanmadan öldürülmeleri ve incelenmeleri gerekir. Parental (P) dişiler için doz uygulaması en az beş gün alışma süresinden sonra başlamalıdır ve çiftleşmeden önce en az iki hafta devam etmelidir. P dişilerinin günlük doz uygulaması 3-haftalık çiftleşme süresi, hamilelik boyunca ve F1 dölü sütten kesilinceya kadar devam etmelidir.

Test maddesinin biyolojik birikimi gibi var olan diğer bilgilere dayanılarak doz uygulama planının yeniden düzenlenmesi düşünülebilir.

Çiftleşme işlemi

Üreme toksisite çalışmalarında ya 1:1 (bir erkeğe bir dişi) ya da 1:2 (bir erkeğe iki dişi) şeklinde çiftleştirme kullanılabilir.
1:1 çiftleştirmesi esas alınarak, hamilelik gerçekleşinceye veya üç hafta geçinceye kadar bir dişi aynı erkekle yerleştirilir. Dişiler her sabah sperm veya vajinal tıkaç varlığı için incelenmelidir. Hamileliğin 0 ıncı günü, sperm veya vajinal tıkacınbulunduğu gün olarak tanımlanır.

Yavrusu olmayan çiftler kısırlığın gözle görülür nedenini belirlemek için değerlendirilmelidir. Bu değerlendirmeye ispatlanmış diğer erkek ve dişilerle çiftleşme fırsatları, üreme organlarının mikroskop altında incelenmesi ve cinsellik aktivitesi durumu döngüsünün ve spermatogenezin incelenmesi gibi bazı işlemler dahildir.

Yavru büyüklükleri

Doğurganlık çalışması sırasında doz uygulanan hayvanların normal doğum yapmalarına ve yavrularını sütten kesilinceye kadar beslemelerine yavrular standardize edilmeden izin verilir. Standardizasyonun yapıldığı durumlarda aşağıdaki işlem önerilir. Doğumdan sonraki 1. ve 4. gün arasında her bir yavrunun büyüklüğü fazladan yavrular atılarak, mümkün olduğunca yavru başına dört erkek ve dört dişi olacak şekilde ayarlanır. Erkek ve dişi yavruların sayısının yavru başına her bir cinsiyetten dört adet olmasını engellediği durumlarda kısmi düzeltmeler (örneğin beş erkek ve üç dişi) kabul edilir. Sekizden daha az sayıda yavrular için düzeltme yapılması uygun değildir.
Gözlemler

Test süresi boyunca her bir hayvan günlük olarak en az bir defa gözlenmelidir. İlgili davranışsal değişiklikler, zor ve uzamış doğum belirtileri ve ölüm dâhil toksisitenin tüm belirtileri kaydedilmelidir. Çiftleşme öncesi ve çiftleşme sürelerinde, gıda tüketimi günlük olarak ölçülebilir. Doğum sonrasında ve süt salgılanması sırasındaki gıda tüketimi ölçümleri (ve test maddesi içme suyuyla verilmişse su tüketimi ölçümleri) yavruların tartıldığı aynı gün yapılmalıdır. P erkekleri ve dişileri dozun uygulandığı ilk gün ve sonrasında en az haftalık olarak tartılmalıdır. Bu gözlemler her bir yetişkin hayvan için ayrı ayrı rapor edilmelidir.

Hamilelik süresi hamileliğin 0. gününden itibaren hesaplanmalıdır. Her yavru doğumdan hemen sonra yavruların sayı ve cinsiyetlerinin, ölü ve canlı doğumların ve büyük anomalilerin olup olmadığının belirlenmesi için incelenmelidir.

Ölü yavrular ve 4üncü gün gözden çıkarılan yavrular olası bozukluklar için muhafaza edilir ve çalışılırlar. Canlı yavrular sayılmalı ve deney sonlandırılıncaya kadar yavrular doğumdan sonraki sabah ve 4. , 7. günlerde ve sonrasında da haftalık olarak ayrı ayrı tartılmalıdır. Dişilerde veya döllerde gözlenen fiziksel ve davranışsal anomaliler kaydedilmelidir.

Patoloji

Otopsi

P nesli hayvanları çalışma boyunca gözden çıkarılma ve ölüm zamanlarında gözle görülerek yapısal anomalilere veya patolojik değişikliklere karşı, üreme sistemi organlarına özel önem verilerek incelenmelidir. Ölmüş veya ölmek üzere olan yavrular bozukluklar için incelenmelidir.

Histopatoloji

Bütün P hayvanlarının yumurtalık, uterus, serviks, vajina, testis, epididimis, seminal kese, prostat, pıhtılaşma bezleri, hipofiz bezleri ve hedef organları mikroskobik inceleme için muhafaza edilmelidir. Bu organların diğer çoklu doz çalışmalarında incelenmediği durumlarda, tüm yüksek doz ve kontrol grubuna ait hayvanların ve çalışma sırasında ölen hayvanların organları mikroskop altında incelenmelidir.

Bu hayvanlar arasında anomali gösteren organlar diğer tüm P hayvanlarında incelenmelidir. Bu durumlarda, büyük patolojik değişiklik gösteren tüm dokular mikroskop altında incelenmelidir. Çiftleşme işlemlerinde tavsiye edildiği gibi kısırlık şüphesi olan hayvanların üreme organları da mikroskop altında incelenmelidir.

2. VERİLER

Veriler her bir test grubu için, testin başlangıcındaki hayvan sayısını, doğurgan erkek sayısını, hamile dişilerin sayısını, değişiklik türlerini ve her bir değişiklik türünü gösteren hayvan yüzdesini gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir.
Olası durumlarda, sayısal sonuçlar uygun bir istatistiksel yöntemle değerlendirilmelidir. Bilinen herhangi bir istatistiksel yöntem kullanılabilir

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, mümkünse, aşağıdaki bilgileri içermelidir:
- kullanılan tür/ırk;

- doz ve cinsiyete bağlı toksik cevap verileri, doğurganlık, hamilelik ve yaşama kabiliyeti dahildir,
- çalışma sırasındaki ölüm zamanı veya hayvanların planlanan gözden çıkarılmalara veya alışmanın sonlandırılmasına kadar yaşayıp yaşamadıkları,
- her bir yavrunun ağırlığını gösteren tablo, ortalama: yavru ağırlıkları ve çalışmanın sonunda yavruların ayrı ayrı ağırlıkları,
- üreme, döl ve postnatal büyüme üzerine toksik ve diğer etkiler
- her bir anormal etkinin ve devamının gözlendiği gün,
- P hayvanları için vücut ağırlığı verileri,
- otopsi bulguları,
- mikroskopik bulguların detaylı tanımları
- uygun yerlerde, sonuçların istatistiksel uygulamaları,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

B.35. İKİ NESİLLİ ÜREME TOKSİSİTESİ ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 416 (2001)'e eşdeğerdir.

1.1. Giriş

İki nesilli üreme test yöntemi, test maddesinin, gonadal (yumurtalıkla ilgili) fonksiyon, estrus döngüsü (yumurtalıklarda bir veya birden fazla yumurtanın olgunlaştırılarak atıldığı ya da bir veya iki defa görülen ve gebe kalınabilecek tek zaman olan devre), çiftleşme davranışı, gebeliğin başlaması, hamilelik, doğum, süt salgılanması, sütten kesilme ve dölün büyümesi ve gelişimini de içine alarak, erkek ve dişi üreme sistemlerinin bütünlüğü ve performansı üzerindeki etkileri hakkında genel bilgi sağlamak için tasarlanmıştır.

Çalışma ayrıca test maddesinin neonatal (yeni doğana ait) hastalık, ölüm ve doğum öncesi ve doğum sonrası gelişimsel toksisite hakkında ön bilgi sağlar ve daha sonraki testler için rehberlik yapar. F1 neslinin büyüme ve gelişme çalışmalarına ilaveten, bu test yöntemi erkek ve dişi üreme sistemlerinin bütünlüğünü ve F2 neslinin büyümesini ve gelişmesini değerlendirmesi için tasarlanmıştır. Gelişimsel toksisite ve fonksiyonel bozukluklar hakkında daha fazla bilgi gelişimsel toksisite ve/veya uygunsa gelişimsel nörotoksisite yöntemlerine başvurularak ilave çalışma bölümleri bu protokole eklenebilir ya da bu sonlanma noktaları ayrı bir çalışmada uygun test yöntemleri kullanılarak çalışılabilirler.

1.2. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi kademeli dozlarda çeşitli gruptaki dişi ve erkeklere uygulanır. P nesli erkekleri, büyümeleri süresince ve en az bir spermatojenik döngü boyunca test maddesinin spermatojenez üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya çıkarmak için (farelerde yaklaşık 56 gün, sıçanlarda 70 gün) doza maruz kalmalıdırlar. Spermdeki etkiler, (örneğin sperm morfolojisi (canlılarda dış şekillerden bahseden bilgi) ve hareketliliği) sperm parametrelerinin sayısı, doku hazırlığı ve detaylı histopatolojik incelemelerle belirlenir. Daha öncesinde yeterli sürede yürütülmüş örneğin 90 günlük tekrarlı doz çalışmalarından elde edilen spermatojenez verileri mevcutsa, P nesli erkeklerinin değerlendirilmeye dâhil edilmesine gerek yoktur. P neslinin örneklerine veya spermlerine ait kayıtlar (dijital okumalar), daha sonra değerlendirilmek üzere saklanmalıdır. Parental (P) neslin dişileri, test maddesinin estrus üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya çıkarmak için en az iki tam estrus döngüsü boyunca doza maruz kalmalıdırlar. Test maddesi parental (P) hayvanlara çiftleşmeleri sırasında, sonuçlanan hamilelikler boyunca ve F1 döllerinin sütten kesilmesi boyunca uygulanır. Sütten kesilme sırasında maddenin uygulanmasına F1 dölü erişkin olup, çiftleşip ve bir F2 nesli meydana getirip, F2 nesli sütten kesilinceya kadar devam edilir.

Klinik gözlemler ve patolojik incelemeler, dişi ve erkek üreme sistemlerinin performansı ve dölün büyümesi ve gelişmesi ve bütünlüğü üzerindeki etkilere özel önem verilerek ve toksisite belirtileri için tüm hayvanlara yapılır.

1.3. Test yönteminin tanımlanması

1.3.1. Hayvan türlerinin seçimi

Test için tercih edilen tür sıçandır. Başka türler kullanılırsa, geçerli bir neden belirtilmelidir ve uygun modifikasyonlar gerekli olacaktır. Doğurganlığı düşük olan suşlar veya gelişimsel bozukluk gelişme sıklığının yüksek olduğu iyi bilinen suşlar kullanılmamalıdır. Çalışmanın başında kullanılan hayvanların ağırlık değişimleri en az olmalı ve her bir cinsiyet için ortalama ağırlığın %20'sini geçmemelidir.

1.3.2. Barınma ve beslenme koşulları

Deney hayvanları için oda sıcaklığı 22°C derece (± 3°C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranı en az %30 olmalı ve tercihen odanın temizlenmesi sırası dışında, %70'i geçmemelidir amaç % 50-60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır. Beslenme için, geleneksel laboratuvar yiyecekleri sınırsız içme suyunun sağlanması şartıyla kullanılabilir. Bu yöntemle uygulandığında, test maddesinin uygun bir karışımının temin edilmesi ihtiyacı beslenme şeklinin seçimini etkileyebilir.
Hayvanlar ayrı ayrı veya aynı cinsiyetten küçük gruplar halinde kafeslere yerleştirilebilirler. Çiftleşme işlemleri amaca uygun kafeslerde uygulanmalıdır. Çiftleşme kesinleştikten sonra, çiftleştirilen dişiler tek başlarına doğum veya gebelik kafeslerine yerleştirilirler. Çiftleştirilen sıçanlar ayrıca küçük gruplar halinde tutulabilirler ve doğumdan bir veya iki gün önce ayrılırlar. Çiftleştirilen hayvanların doğuma yakın zamanda uygun ve belirlenmiş yuvalara yerleşmeleri sağlanabilir.

1.3.3. Hayvanların hazırlanması

En az 5 gün öncesinden laboratuvar şartlarına alıştırılmış ve öncesinde deneysel muameleye maruz kalmamış sağlıklı genç hayvanlar kullanılmalıdır. Test hayvanları tür, ırk, kaynak, cinsiyet, ağırlık ve/veya yaşa göre karakterize edilmelidir. Kardeşlerin çiftleştirilmesinden kaçınılması için hayvanlar arasında herhangi bir kardeş ilişkisi olmalıdır. Hayvanlar kontrol ve muamele grupları olarak gelişigüzel seçilmelidirler (vücut ağırlıklarına göre ayırma tercih edilir) Kafesler, yerleştirilmelerinden meydana gelebilecek olası etkiler en aza indirilecek şekilde ayarlanmalıdır. Her hayvana kendisine özgü kimlik numarası verilmelidir. P nesli için bu, doz uygulamasına başlamadan önce yapılmalıdır. F1 nesli için bu, çiftleşme için seçilen hayvanlar sütten kesildikten sonra yapılmalıdır. Başlangıçtaki bir batında doğan yavruları belirten tüm kayıtlar, seçilen bütün F1 hayvanları için elde edilmelidir. İlaveten,köpek yavrularının ayrı ayrı tartılmaları gerektiğinde veya fonksiyonel testlerin uygulanması düşünüldüğünde, doğumdan hemen sonra köpek yavrularının ayrı ayrı kimliklendirilmeleri tavsiye edilir.
Parental (P) hayvanlar doz uygulanmasına başlandığında 5-9 haftalık arasında olmalıdırlar. Tüm test gruplarına ait hayvanlar, olabildiğince aynı yaş ve ağırlıkta olmalıdır.

1.4. İşlem

1.4.1. Hayvanların sayısı ve cinsiyeti

Her bir test ve kontrol grubu doğumda veya doğuma yakın 20'den az olmayacak şekilde hamile dişiler içermelidir. Bu durum muameleye-bağlı olarak olumsuz etki (örneğin kısırlık, yüksek dozda fazla toksisite) meydana getiren maddeler için mümkün değildir. Amaç,

maddenin F1 dölünde gebeliğin başlamasından doğumun meydana gelmesine kadar doğurganlık, hamilelik ve maternal davranışlarla emzirme, büyüme ve gelişimi üzerindeki etki potansiyelini ve döllerinin (F2) gelişiminden emzirmenin sonuna kadarki etkilerini anlamlı şekilde değerlendirmek için yeterli sayıda hamilelik meydana getirmektir. Bu yüzden, istenilen hamile hayvan sayısına (örneğin 20) ulaşılamadığı takdirde, çalışmanın geçersiz kılınmasına gerek yoktur ve vaka vaka değerlendirilmelidir.

1.4.2. Dozların hazırlanması

Başka bir uygulama yolunun (örneğin dermal (ciltle ilgili) veya solunum) daha uygun olduğu düşünülmedikçe, test maddesinin oral (sonda ile besleme veya diyetle veya içme suyuyla) uygulanması tavsiye edilir.
Gerekli olduğunda test maddesi uygun bir taşıyıcıda çözülür veya askıda kalır. Uygun olan her yerde sulu çözelti/süspansiyon kullanımının ilk önce düşünülmesi tavsiye edilir, bunu yağda (örneğin mısır yağı) çözelti/emülsiyon kullanımı ve diğer taşıyıcılardaki uygun çözelti kullanımı izler. Su dışındaki taşıyıcıların toksisite özellikleri bilinmelidir. Test maddesinin taşıyıcıdaki kararlılığı belirlenmelidir.

1.4.3. Dozaj

En az üç doz ve eş zamanlı kontrol kullanılmalıdır. Test maddesinin fizikokimyasal doğası veya biyolojik etkileriyle sınırlanmadıkça, en yüksek doz toksisiteyi indüklemeli fakat parental (anne-baba) (P) hayvanlarda ölüm veya acı oluşturmamalıdır. Beklenmeyen ölüm durumunda, parental (P) hayvanlarda yaklaşık %10'dan daha az bir ölüm hızı kabul edilebilirdir. Dozların azalan dizisi doz-cevap veya olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviyeyi (NOAEL) gösterecek şekilde seçilmelidir. İki –dört kat aralıklar azalan doz seviyeleri için genelde en uygunudur ve dördüncü bir test grubunun ilave edilmesi doz grupları arasında geniş aralıklar kullanılmasına (örneğin 10 faktörden daha fazla) genellikle tercih edilir. Beslenmeyle ilgili çalışmalar için doz aralığı 3 kattan daha fazla olmamalıdır. Dozlar, mevcut toksisite verileri ve özellikle de tekrarlı doz çalışmalarından elde edilen veriler dikkate alınarak seçilmelidir. Test bileşiğinin veya ilgili maddelerin metabolizması veya toksikokinetiğiyle ilgili ilave bilgiler de dikkate alınmalıdır. İlaveten bu bilgi, doz uygulama kürünün yeterliliğinin gösterilmesine yardımcı olacaktır.

Bu grup, muamele edilmemiş bir kontrol grubu olmalı veya test maddesi uygulanırken taşıyıcı kullanılmışsa taşıyıcı-kontrol grubu olmalıdır. Test maddesiyle muamele edilenler hariç, kontrol grubundaki hayvanlar test grubundakilerle eşit şekilde elde tutulmalıdırlar. Taşıyıcı kullanılmışsa, kontrol grupları kullanılan en yüksek miktarda taşıyıcı alır. Eğer test maddesi diyetle uygulanır ve gıda alımının veya kullanımının azalmasına neden olursa, o zaman çift beslenmiş kontrol grubunun kullanılmasının gerekli olduğu düşünülebilir. Alternatif olarak üremeyle ilgili parametrelerdeki gıda tüketiminin azalmasının etkilerini değerlendirmek için tasarlanan kontrol edilmiş çalışmalardan elde edilen veriler, eş zamanlı eşlenmiş beslenmiş kontrol grubunun yerine kullanılabilir.

Taşıyıcı ve diğer katkıların belirtilen özelliklerinin üzerinde durulmalıdır: absorpsiyon (emilim), dağılım, metabolizma veya test maddesinin alıkonması üzerine etkiler, test maddesinin toksisite özelliğini değiştirebilecek olan kimyasal özellikleri üzerine etkiler veya gıda ve su tüketimi veya hayvanların beslenme durumu üzerine etkiler.

1.4.4. Sınır testi

En az 1 000 mg/kg vücut ağırlığı tek dozun kullanıldığı bir oral çalışma veya bu çalışma için tanımlanan işlemler kullanılarak diyetle ya da içme suyuyla yapılan bir uygulama için diyet veya içme suyundaki eşit yüzde hem parental hayvanlarda hem de onların döllerinde gözlenebilir bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve yapısal olarak benzer maddelerle ilgili verilere dayanılarak toksisite beklenmiyorsa, bu durumda çeşitli dozlar kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. Beklenen insan maruz kalması daha yüksek doz kullanılması gerektiğine işaret etmedikçe sınır testi uygulanır. Solunum veya dermal uygulamalar gibi diğer uygulama tipleri için test maddesinin çözünürlük gibi fizikokimyasal özellikleri en fazla ulaşılabilir maruz kalmayı işaret eder ve onu sınırlar.

1.4.5. Dozların uygulanması

Hayvanlar test maddesiyle haftanın 7 günü muamele edilerek doza maruz kalmalıdır. Tercih edilen uygulama yolu oral (örneğin, diyeti, içme suyu, sonda ile besleme) uygulamadır. Başka bir uygulama yolu kullanılacaksa gerekçelendirilir ve uygun modifikasyonlar yapılabilir. Tüm hayvanlar deney süresi boyunca aynı yöntemle doza maruz kalmalıdır. Test maddesi sondayla gavaj yöntemi kullanılarak uygulanmalıdır. Tek seferde uygulanabilecek olan maksimum sıvı hacmi, sulu çözeltiler için 2 ml/100 vücut ağırlığı kullanılabilen durumlar haricinde, 1 ml/l00 g vücut ağırlığını geçmemelidir (mısır yağı için en fazla vücut ağırlığı 0.4 ml/100 g). Normalde daha yüksek konsantrasyonlarda daha kötü etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için konsantrasyonunun tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla test hacmindeki değişkenler en aza indirilmelidir. Sonda ile besleme çalışmalarında köpek yavruları normalde test maddesini sütten kesilmeden sonra doğrudan doz uygulaması başlayıncaya kadar, sadece dolaylı olarak sütten alırlar. İçme suyu veya diyet çalışmalarında süt salgılama periyodunun son haftasında, köpek yavrusu kendileri yemeğe başlayınca ilave olarak test maddesini doğrudan alırlar.

Diyet veya içme suyuyla uygulanan maddeler için, gerekli test maddesinin hiçbir miktarının normal beslenme veya su dengesiyle etkileşmediğinin garanti edilmesi önemlidir. Test maddesi ya sabit diyet konsantrasyonu (ppm) ya da hayvanların vücut ağırlığı üzerinden kullanılabilen sabit doz olarak uygulandığında, kullanılan alternatif belirtilmelidir. Sondayla uygulanan maddeler için, doz her gün aynı zamanlarda verilmelidir ve hayvan vücut ağırlığına dayanarak sabit doz elde etmek için gerektiği şekilde ayarlanmalıdır. Ağırlığa bağlı sonda ile besleme dozu dozu ayarlanırken plasental dağılım hakkında bilgi göz önünde bulundurulmalıdır.

1.4.6. Deney programı

Parental (P) erkeklerin ve dişilerin günlük doz uygulamaları, hayvanlar beş-dokuz haftalıkken başlamalıdır. F1 erkek ve dişilerinin günlük doz uygulamaları sütten kesilmeyle başlar, test maddesinin diyet veya içme suyuyla uygulandığı durumlarda, F1 köpek yavrularının test maddesine doğrudan maruz kalması süt salgılama periyodu sırasında zaten gerçekleşmiş olabilir. Her iki cinsiyet için de (P ve F1) doz uygulanmasına çiftleşme sürecinden önce en az 10 hafta devam edilmelidir. Doz uygulanmasına her iki cinsiyette de 2 haftalık çiftleşme süresi boyunca de devam edilir. Erkekler üreme üzerine etkilerin değerlendirimesinde artık ihtiyaç kalmamışsa, insanca öldürülmeli ve incelenmelidirler. Parental (P) dişilerinin günlük doz uygulaması hamilelik boyunca ve F1 dölü sütten kesilinceye kadar devam etmelidir. Test maddesiyle ilgili indüklenme, biyolojik birikim gibi diğer bilgilere dayanılarak doz uygulama

planının yeniden düzenlenmesi düşünülebilir. Her bir hayvana uygulanacak doz normalde hayvanların ayrı ayrı alınan en son vücut ağırlıklarına dayanrak belirlenir. Ancak, hamileliğin son üç ayındaki doz ayarlanmasına dikkat edilmelidir.

P ve F1 erkek ve dişilerinin muamele edilmelerine deneyin sonlandırılmasına kadar devam edilir. Tüm P ve F1 erişkin erkek ve dişileri üreme üzerine etkilerin değerlendirilmesine artık ihtiyaç kalmadığı zaman insanca öldürülmelidir. Çiftleşme için seçilmeyen F1 dölü ve tüm F2 dölleri sütten kesildikten sonra insanca öldürülmelidir.

1.4.7. Çiftleşme işlemi

1.4.7.1. Parental (P) çiftleşme

Her bir çiftleşme için her bir dişi birleşme gerçekleşinceye veya 2 hafta geçinceye kadar aynı doz grubundan bir erkekle birlikte yerleştirilmelidir (1:1 çiftleşme). Dişiler her gün sperm veya vajinal tıkaçların varlığı için incelenir. Hamileliğin 0 ıncı günü, sperm veya vajinal tıkaçların bulunduğu gün olarak tanımlanır. Çiftleşmenin başarısız olduğu durumlarda, dişilerin aynı gruptan ispatlanmış erkeklerle yeniden çiftleştirilmesi düşünülmelidir. Çiftleşen çiftler verilerde açıkça tanımlanmalıdır. Kardeşlerin çiftleşmesinden kaçınılmalıdır.

1.4.7.2. F1 çiftleşmesi

F1 dölünün çiftleşmesi için, emzirmenin bitiminde her bir batında doğan yavrulardan, en az bir erkek ve bir dişi aynı dozdaki fakat farklı olan diğer batında doğan yavrularla çiftleştirilerek, F2 nesli oluşturması için en az bir erkek ve bir dişi seçilmelidir. Vücut ağırlıklarında veya yavru çiftlerin görünüşleri arasında önemli değişiklikler gözlenmediğinde, her bir batında doğan yavrunun seçimi rastgele yapılmalıdır. Değişikliklerin gözlendiği durumlarda , her bir batında doğan yavrunun en iyi temsilcisi seçilmelidir. Yararlı olması için en iyisi vücut ağırlığının esas alınmasıdır fakat görünüşün esas alınması daha uygun olabilir. F1 dölü tamamen cinsel olgunluğa erişmeden çiftleştirilmemelidir.

Yavrusu olmayan çiftler kısırlığın gözle görülür nedenini belirlemek için değerlendirilmelidir. Bu değerlendirmeye ispatlanmış diğer erkek veya dişilerle çiftleşme fırsatları, üreme organlarının mikroskop altında incelenmesi ve estrus döngüsünün ve spermatogenezin incelenmesi gibi bazı işlemler dahildir.

1.4.7.3. İkinci çiftleşme

Muameleye bağlı bir batında yavru büyüklüğü değişiklikleri veya ilk çiftleşmedeki şüpheli etkilerin gözlenmesi gibi, belli durumlarda P veya F1 erişkinlerinin ikinci bir batın meydana getirmesi için tekrar çiftleştirilmeleri tavsiye edilir. Karşı cinsin ispatlanmış damızlıklarıyla yavru meydana getirmeyen dişi veya erkeklerin yeniden çiftleştirilmesi tavsiye edilir. Eğer ikinci bir yavrunun meydana gelmesi her iki nesil için de gerekli görülüyorsa, hayvanlar son yavrunun sütten kesilmesinden yaklaşık bir hafta sonra yeniden çiftleştirilmelidir.

1.4.7.4. Yavru büyüklüğü

Hayvanlar normal doğum yapmalılar ve döllerini sütten kesilinceye kadar beslemeliler. Yavru büyüklüğünün standardizasyonu isteğe bağlıdır. Standardizasyon yapıldığında, kullanılan yöntem detaylarıyla açıklanmalıdır.

1.5. Gözlemler

1.5.1. Klinik gözlemler

Genel klinik gözlemler her gün yapılmalı ve dozun sondayla uygulandığı durumlarda zamanlama yapılırken doz uygulanmasından sonra beklenen pik süresi dikkate alınmalıdır. Davranış değişiklikleri, zor ve uzamış doğum ve tüm toksisite belirtileri kaydedilmelidir. İlave olarak her bir hayvanın daha detaylı incelenmesi en az haftalık olarak yürütülmeli ve hayvanın tartıldığı zamanki durumuna göre uygulanmalıdır. Günde iki defa, uygunsa, hafta sonunda günde bir defa tüm hayvanlarda hastalık ve ölüm durumları gözlenmelidir.

1.5.2. Parent (anne-baba) hayvanların vücut ağırlıkları ve gıda/su tüketimleri

Parental hayvanlar (P and Fl) dozun uygulandığı ilk gün ve sonrasında en az haftalık olarak tartılmalıdır. Parental dişiler (P and F1) hamileliğin 0, 7, 14 ve 20 veya 21. günlerinde, süt salgılanması sırasında, yavruların tartıldığı günde ve hayvanların öldürüldüğü gün tartılmalıdır. Bu gözlemler, her bir erişkin hayvan için ayrı ayrı rapor edilmelidir. Çiftleşme öncesi ve hamilelik süresinde yiyecek tüketimleri en az haftalık olarak ölçülür. Test maddesi su içinde uygulanmışsa, su tüketimi en az haftalık olarak ölçülür

1.5.3. Estrus döngüsü

Estrus döngüsü uzunluğu ve normalliği P ve F1 dişilerinde çiftleşme öncesinde ve isteğe bağlı olarak çiftleşme sırasında çiftleşmenin gerçekleştiğinin kanıtı bulununcaya kadar, vajinal sıvı alınarak değerlendirilir. Vajinal/servikal hücreler elde edilirken, mukozanın bozulmamasına ve yalancı hamileliğin meydana gelmemesine özen gösterilmelidir (1).

1.5.4. Sperm parametreleri

Sonuçta P ve F1 erkekleri için, testis ve epididimis ağırlıkları kaydedilir ve her organdan biri histopatolojik inceleme için muhafaza edilir (bakınız kısım 1.5.7, 1.5.8.1). Her bir P ve F1 grubunda en az on erkeğin alt kümesinin kalan testis ve epididimisleri sırasıyla homojenizasyon dirençli spermatitler ve kauda epididimal sperm kaynaklarının sayılması ve sıralanması için kullanılmalıdır. Aynı erkek altkümesi için, cauda epididimides spermleri veya vas deferens (spermi epididimlerden boşaltma bölümüne taşıyan kanal) sperm hareketi ve morfolojisi (yapı bilimi) için toplanmalıdır. Muameleye bağlı etkiler gözlenirse veya diğer çalışmalardan spermatojenez (spermatozoid oluşumu) üzerinde etki görülebileceğinin kanıtları varsa, her bir doz grubundaki tüm erkeklerin spermleri incelenmelidir; aksi takdirde sıralama ve sayılma kontrol ve yüksek doz grubu P ve F1 erkekleriyle sınırlı olacaktır.

Homojenizasyon dirençli yumurta şeklindeki spermatitler ve kauda epididimal sperm sıralanmalı ve sayılmalıdır (2)(3). Kauda sperm kaynakları, nitel değerlendirmelerin tamamlanması için kullanılan süspansiyonun içindeki spermin hacim ve konsantrasyonundan türetilebilir ve yeniden toplanan sperm sayısı kalan kauda dokunun kıyılması ve/veya homojenizasyonuyla yapılır. Sayma ve sıralama hayvanlar öldürüldükten hemen sonra video veya dijital kayıt yapılmamışsa veya örnekler dondurulup sonra analiz edilmemişse, doz uygulanan tüm gruplardan seçilen erkeklerin altkümelerinde uygulanmalıdır. Bu durumlarda, ilk önce kontrol ve yüksek doz grupları analiz edilebilir. Muameleye bağlı etkiler (örneğin sperm sayısı, hareketi ve morfolojisi ile ilgili) görülmemişse, diğer doz gruplarının analiz

edilmesine gerek yoktur. Yüksek doz grubunda muameleye bağlı etkiler kaydedilmişse, daha düşük doz grupları da ayrıca değerlendirilmelidir. Epididimal (veya deferent) sperm hareketi değerlendirilmelidir veya gözden çıkarıldıktan hemen sonra video kasete alınmalıdır. Hasar en azda tutularak sperm kurtarılır ve uygun yöntemler kullanılarak hareketlilik analizi için seyreltilmelidir (4). Kademeli olarak hareketli sperm yüzdesi öznel ya da nesnel olarak belirlenmelidir. Bilgisayar destekli hareket analizi uygulandığında (5)(6)(7)(8)(9)(10) kademeli hareketliliğin türevi, kullanıcının tanımladığı ortalama yol hızı ve eşik değerlere doğruluk (istikamet) veya doğrusal indekstir. Örnekler videokasete alınırsa (11) veya otopsi anındaki görüntü kaydedilirse, muameleye bağlı etkiler gözlenmedikçe, sonraki analizler sadece kontrol ve yüksek doz P ve F1 erkekleri için uygulanır, bu durumda daha düşük doz gruplarıda değerlendirilmelidir. Video veya dijital görüntü yoksa muamele grubundaki bütün örnekler otopside analiz edilmelidirler.

Epididimal (veya vas deferens) sperm örneklerinin morfolojik incelemesi yapılmalıdır. Sperm (örnek başına en az 200) sabitlenmiş, ıslak preparatlar olarak incelenmeli ve hem normal hemde anormal olarak sınıflandırılmalıdır. Morfolojik sperm anomali örnekleri erimiş, ayrılmış ve biçimsiz kafalar ve/veya kuyruk olabilir. Değerlendirme, ya hayvanlar öldürüldükten hemen sonra veya daha sonraki video ve dijital kayıtlara dayanılarak, ileri bir tarihte, tüm doz gruplarının erkek altkümelerinde uygulanmalıdır. Simir (smear) (lam üzerine sürülen madde) bir defa sabitlenir ve sonraki bir zamanda okunabilirler. Bu gibi durumlarda, kontrol ve yüksek doz grupları ilk önce analiz edilir. Muameleye bağlı etki yoksa, (örneğin sperm morfolojisine etkiler) diğer doz gruplarının analiz edilmesine gerek yoktur. Muameleye bağlı etkilerin yüksek doz grubunda görüldüğü durumlarda, düşük doz grupları da ayrıca değerlendirilmelidir.

Yukarıdaki sperm değerlendirme parametrelerinden herhangi biri en az 90 günlük bir sistematik toksisite çalışmasının bir kısmı olarak daha önceden değerlendirilmişse, iki nesilli çalışmada tekrar edilmelerine gerek yoktur. Gerekliyse, daha sonraki değerlendirme için P nesline ait sperm örneklerinin veya dijital görüntülerinin saklanması tavsiye edilir.

1.5.5. Döl

Köpek yavrusu sayısı ve cinsiyetlerini, ölü doğumları, canlı doğumları ve büyük anomalileri belirlemek için herbir yavru doğumdan hemen sonra (kıktasyon emzirmenin o. Günü) incelenmelidir. 0. günde ölü bulunan köpek yavruları suda bırakılıp yumuşatılmadıysa, olası eksiklikler ve ölüm nedeni için incelenmeli ve muhafaza edilmelidir. Canlı köpek yavruları doğumda (emzirme 0. gün) ve 1. gün ve sonrasında düzenli olarak, emzirmenin 4, 7, 14 ve 21. günlerinde, ayrı ayrı sayılmalı ve tartılmalıdır. Anne ve yavrulardaki fiziksel ve davranışsal anomaliler kaydedilmelidir. Yavruların fiziksel gelişimi özellikle vücut ağırlığı artışı kaydedilmelidir. Diğer fiziksel parametreler (örneğin kulak ve göz açıklıkları, diş döküntüsü, tüylerin büyümesi) tamamlayıcı bilgi sağlayabilir fakat bu veriler tercihen cinsel olgunlukla ilgili veriler bağlamında değerlendirilecektir. (örneğin vajinal açıklık veya prepüsyal ayrılmada vücut ağırlığı ve yaş) (13). F1 yavrusunun sütten kesilmeden önceki ve sonraki fonksiyonel araştırmaların (motor aktivite, duyu fonksiyonları, refleks ontogenez (organizmanın kaynak ve gelişimi)) özellikle de cinsel olgunlukla ilgili olanlar, eğer bu araştırmalar ayrı bir çalışmanın konusu değilse, yapılması tavsiye edilir. Çiftleşme için seçilen sütten yeni kesilen F1 yavruları için vajinal açıklığın erginliği ve prepüsyal ayrılma belirlenmelidir. F1 cinsiyet oranındaki değişikliklerle ve cinsel olgunluğun zamanlamasıyla tetiklenmişse, anogenital (anusa ve genital bölgeye ait olan) uzaklık doğum sonrası 10 uncu günde F2 köpek yavrularında ölçülmelidir.

Aksi takdirde çok açık olumsuz etki belirtileri gösterecek olan gruplar için fonksiyonel gözlemler ihmal edilebilir (örneğin kilo alımında anlamlı düşüş vs.). Fonksiyonel araştırmalar yapılırsa, çiftleşme için seçilen köpek yavrularla yapılmamalıdır.

1.5.6. Tam teşekküllü otopsi

Sonlandırmada veya çalışma sırasında ölümlerde tüm parental hayvanlar (P and F1), harici anomalileri veya klinik belirtileri olan tüm köpek yavrularıyla beraber F1 ve F2 neslinden rast gele seçilen bir köpek yavrusu/cinsiyet/yavru yapısal anomaliler veya patolojik değişiklikler için incelenir. Üreme sistemi organlarına özel önem verilmelidir. Ölmek üzere olduğu için insani nedenlerle öldürülen ve ölü köpek yavruları olası eksiklikler ve/veya ölüm nedenleri için incelenmeli ve muhafaza edilmelidirler.

İlk defa doğuran dişilerin rahimleri implantasyon yerlerinin sayıları ve varlıklarının belirlenmesi için histopatolojik değerlendirmeyle uyuşmayan bir biçimde incelenmelidir.

1.5.7. Organ ağırlıkları

Sonuçta tüm P and F1 parental hayvanların vücut ağırlığı ve aşağıdaki organların ağırlıkları belirlenir (çift organlar ayrı ayrı tartılır):
— döl yatağı(uterus), yumurtalıklar;
— testis, epididimler (toplam ve cauda);
— prostat;
— seminal veziküller ve pıhtılaştırma bezleri ve onların akışkanları ve prostat (bir birim olarak);
— beyin, karaciğer, böbrekler, dalak, pituitary, tiroid ve adrenal bezler ve bilinen hedef organlar

Son vücut ağırlıkları otopsi için seçilen F1 ve F2 köpek yavruları için belirlenmelidir. köpek yavrusu/cinsiyet/bir batında doğan yavru birinden rastgele seçilen aşağıdaki organlar tartılabilir (Bakınız kısım 1.5.6): beyin, dalak ve timüs.

Ayrıntılı otopsi ve organ ağırlığı sonuçları uygun olduğunda, diğer tekrarlı doz çalışmalarında yapılan gözlemlerle beraber değerlendirilir.

1.5.8. Histopatoloji

1.5.8.1. Parental Hayvanlar

Parental (P and F1) hayvanlara ait aşağıdaki dokular ve organlar veya temsili örnekleri histopatolojik inceleme için uygun bir ortamda sabitlenmeli ve saklanmalıdır.

— vajina, uterus ve serviks, ve yumurtalıklar (uygun sabitleyicide korunurlar);
— bir testis (Bouin veya karşılaştırılabilir bir sabitleyicide korunur), bir epididimis, seminal kese, prostat ve pıhtılaştırma bezi;
—çiftleşme için seçilen tüm P ve F1 hayvanlarının daha önceden belirlenen hedef organ(lar)ı

Yukarıda listelenen muhafaza edilmiş organ ve dokuların tam histopatoloji analizleri çiftleşme için seçilen tüm yüksek doz ve kontrol P ve F1 hayvanlarında yapılmalıdır.P hayvanlarının yumurtalıklarının incelenmesi isteğe bağlıdır.

Muameleye bağlı değişiklikler gösteren organlar ayrıca NOAEL'in aydınlatılmasına yardımcı olmak için düşük ve ara doz gruplarında da incelenmelidirler. İlaveten, doğurganlıklarının azaldığı şüphesi olan örneğin çiftleşmede, hamile kalmada, baba olmada veya sağlıklı yavrular meydana getirmede başarısız olan, düşük ve ara doz grubundaki hayvanların üreme organları veya estrus döngüsü veya sperm sayısı, hareketlilik veya morfolojisi etkilenen hayvanların organlarına histopatolojik inceleme yapılmalıdır. Atrofi veya tümörler gibi bütün büyük lezyonlar (doku yapısı değişikliği) incelenebilir.

Testise ait detaylı histopatolojik inceleme (örnegin Bouin's sabitleyici, parafin yatak ve 4-5 µm kalınlığında çapraz kısımlar kullanılarak) alıkonulan spermatitler, kayıp eşey hücresi tabakası ve tipi, çok çekirdekli çok büyük hücreler veya spermatogenik (spermatozoon oluşturucu) hücrelerin lümende (tüp şeklinde organın içindeki boşluk) birikmesi gibi muameleye bağlı etkilerin belirlenmesi için yürütülmelidir (14). Bütün bir epididimisin incelenmesine, uzunlamasına kesitin değerlendirilmesiyle yapılan kaput, korpus ve kauda incelemeleri dahildir. Epididimis lökosit (akyuvar) süzmesini, hücre tipinin prevalansında (yaygınlık) değişiklikler, aberant hücre tipleri ve spermlerin fagositozu (mikroorganizmaların imha edilmesi) için değerlendirilmelidir. Erkek üreme organlarının incelenmesinde PAS ve hematoksilin boyama kullanılabilir. Postlaktasyonel yumurta, başlangıçta var olan ve büyüme foliküllerini (bezcik) ve laktasyonun büyük corpora luteasını içermelidir. Histopatolojik incelemelerde başlangıçta var olan folikül populasyonunun nitel tükenimi tayin edilmelidir. F1 dişilerinde başlangıçta var olan foliküllerin nicel değerlendirilmesi yapılmalıdır; hayvan sayısı, yumurtalık kesiti seçimi ve örnek kesitin büyüklüğü kullanılan değerlendirme işlemiyle istatistiksel olarak anlamlı olmalıdır. İnceleme, muamele edilmiş ve kontrol yumurtalıkların karşılaştırılmaları için, küçük büyüme folikülleriyle birleştirilebilen başlangıçta var olan foliküllerin sayımını kapsar (15) (16) (17) (18) (19).

1.5.8.2. Sütten kesilme

Büyükçe anormal doku ve hedef organlar harici anormallileri ve klinik belirtileri olan tüm köpek yavrularından ve yanında çiftleşme için seçilmeyen F1 ve F2 nesillerinden rastgele seçilen bir köpek yavrusu/cinsiyet/bir batında doğan yavrudan histopatolojik inceleme için alınıp, uygun bir ortamda sabitlenmeli ve saklanmalıdır. Muhafaza edilen dokuların tam histopatolojik sınıflandırması üreme sistemi organlarına özel önem verilerek yapılmalıdır.

2. VERİLER

2.1. Verilerin uygulanması

Veriler ayrı ayrı rapor edilmeli ve her bir test grubu ve nesil için testin başındaki hayvan sayısını, test sırasında ölü bulunan veya insani nedenlerle öldürülen hayvan sayısını, ölüm veya öldürülme zamanı, doğurgan hayvanların sayısı, hamile dişilerin sayısı, toksisite belirtisi gösteren hayvanların sayısını, gözlenen toksisite belirtilerinin, toksik etkilerin başlama zamanı, süresi ve şiddeti dâhil, detaylı tanımlarını, parental (ana) ve yavru (döl) gözlemlerinin

türleri, histopatolojik değişiklikleri ve bir batında doğan yavruyla ilgili tüm verili tablo halinde özetlemelidir.
Sayısal sonuçlar uygun, genellikle kabul görmüş istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmelidir; İstatistiksel yöntemler çalışmanın bir parçası olarak seçilmeli ve doğrulanmalıdırlar. Doz-cevap ilişkisi istatistiksel modelleri veri analizleri için uygun olabilir. Rapor analiz yöntemiyle ilgili yeterli bilgiyi ve uygulanan bilgisayar programını içermelidir böylece bağımsız eleştirmen/istatistikçi analizi yeniden değerlendirilebilir ve yeniden yapabilir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi

İki nesilli üreme toksisite testinin sonuçları otopsi ve mikroskobik bulguları içeren gözlenen etkiler temel alınarak değerlendirilmelidir. Değerlendirme, test maddesinin dozu ve anomalilerin varlığı veya yokluğu, oluş sıklığı ve şiddeti arasındaki ilişkiyi kapsar. Bu anomalilar büyük lezyonlar (bir dokunun yapı veya vazifesinin patalojik bir sebeple arızaya uğraması), tanımlanan hedef organlar, etkilenmiş doğurganlık, klinik anomaliler, etkilenmiş üreme ve yavru performansı, vücut ağırlığındaki değişiklikler, ölüm üzerindeki etkiler ve diğer toksik etkilerdir. Test maddesinin fizikokimyasal özellikleri ve mevcutsa, toksisitekinetiği verileri test sonuçları değerlendirilirken göz önünde bulundurulmalıdır. Uygun şekilde yürütülen üreme testi hiçbir olumsuz etkinin gözlemlenmediği düzeyin tahmin edilmesini ve üreme, doğum, salgılama, büyüme ve cinsel gelişim dâhil dogum sonrası gelişim üzerindeki olumsuz etkilerin anlaşılmasını sağlamalıdır.

2.3. Sonuçların yorumlanması

İki nesilli üreme toksisite çalışması üreme döngüsünün tüm evreleri boyunca maddeye tekrarlı maruz kalma etkileri hakkında bilgi sağlayacaktır. Çalışma özellikle, üreme parametreleri (karakteristik özellik), dölün gelişmesi, büyümesi, olgunlaşması ve yaşaması üzerine bilgi sağlar. Çalışmanın sonuçları subkronik, doğum öncesi gelişme ve toksikokinetik ve diğer mevcut çalışmalardan elde edilen bulgularla birleştirilerek yorumlanmalıdır. Bu çalışmanın sonuçları kimyasalın ilave bir teste ihtiyacı olup olmadığının değerlendirilmesinde kullanılır. Çalışmanın sonuçlarının ekstrapolasyonu (dış değer bulma) bir sınır değere kadar geçerlidir. Bunlar hiç bir etkinin gözlenmediği ve müsaade edilen insan maruz kalması hakkında en iyi bilgiyi sağlarlar (20) (21) (22) (23).

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test maddesi:
- fiziksel doğası ve, ilgili yerlerde, fizikokimyasal özellikleri;
- kimlik verileri;
- saflık.

Taşıyıcı (uygunsa):
- sudan farklı bir taşıyıcı kullanılmışsa, taşıyıcı seçimi için gerekçe.

Test hayvanları:
- kullanılan türler/ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, beslenme şekli, vs.;
- hayvanların ayrı ayrı testin başındaki, ağırlıkları.

Test koşulları:
- doz seviyelerinin seçimi için gerekçe;
- test maddesinin formülasyonu/besin hazırlanması, ulaşılan konsantrasyonun detayları;
- preparatın homojenliği ve kararlılığı;
- test maddesinin uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- besin/içme suyu test maddesi konsantrasyonu (ppm) mevcut doza (mg/kg vücut ağırlığı/gün) çevrilmesi, eğer uygulanabiliyorsa;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar.
- Sonuçlar:
- gıda ve su tüketimi, eğer mevcutsa, gıda verimliliği (tüketilen her gram gıda başına kazanılan vücut ağırlığı) ve P and F1 hayvanları için, yerleşme süresi hariç ve süt salgılamanın en az son üçte birlik periyodu için test maddesi tüketimi
- absorpsiyon verileri (eğer mevcutsa);
- çiftleşme için seçilen P ve F1 hayvanlarının vücut ağırlıkları;
- bir batında doğan yavruların ve köpek yavrularının ağırlık verileri;
- parental hayvanlar için gözden çıkarılmalardaki vücut ağırlığı ve mutlak ve bağıl organ ağırlık verileri;
- klinik gözlemlerin doğası, ciddiyeti ve süresi (geri dönüşümlü olup olmadıkları);
- çalışma boyunca hayvanların ölüm zamanları veya deney sonlanıncaya kadar sağ kalıp kalmadıkları;
- cinsiyete ve doz düzeylerine bağlı toksisite cevaplar; çiftleşme endeksi (dizin), doğurganlık, hamilelik, doğum, yaşama kabiliyeti ve süt salgılama dahildir; rapor bu endeksler hesaplanırken kullanılan sayıları göstermelidir;
- üreme, döl ve doğum sonrası büyüme vs. üzerine toksik veya diğer etkiler;
- otopsi bulguları;
- histopatolojik bulguların detaylı tanımları;
- normal döngüye ve döngü uzunluğuna sahip P ve F1 dişilerinin sayısı;
- toplam cauda epididimal sperm sayısı, artan şekilde hareketli sperm yüzdesi,
- morfolojik olarak normal sperm yüzdesi ve her bir anormalliğin belirtildiği sperm yüzdesi;
- çiftleşme zamanı, çiftleşmeye kadar geçen gün sayısı;
- gebelik uzunluğu;
- implantasyon sayısı, corpora lutea, yavru büyüklüğü;
- canlı doğumların ve post implantasyon kayıplarının sayısı;
- gözlenebilir anomalileri olan köpek yavruları sayısı, eğer belirlenmişse küçük kalmış hayvanların sayısı da rapor edilmelidir;
- köpek yavrularının fiziksel dönüm noktası verileri ve diğer doğum sonrası gelişme verileri; değerlendirilen fiziksel dönüm noktaları gerekçelendirilmelidir;
- uygulanabiliyorsa, köpek yavruları ve erişkinlerdeki fonksiyonel gözlem verileri;
- uygun yerlerde, sonuçlara ait istatistiksel işlemler.
- Sonuçların tartışılması.
- Sonuçlar, maternal ve döl etkileri için NOAEL değerleri dâhildir.

4. KAYNAKLAR

(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. ReproductiveToxicology 5:39 44

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat,Rabbit, and Dog: a Consensus Report. Reproductive Toxicology 10(3):237-244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. Reproductive Toxicology 6:267- 273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration. Journal of Andrology 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. Reproductive Toxicology 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer- Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: Methods in Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat SpermMotility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

B. 36. TOKSİKOKİNETİK

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi uygun bir yolla uygulanır. Çalışmanın amacına bağlı olarak, madde hayvan gruplarının bir veya birkaç tanesi için belirlenen sürelerin üzerinde tek seferde veya tekrarlanan dozlarda uygulanabilir. Ardından, çalışmanın türüne bağlı olarak madde ve/veya metabolitler (metabolizmadan gelen maddeler) vücut sıvılarında, dokularında ve/veya vücut atıklarında tayin edilir.

Çalışmalar, test maddesinin 'işaretlenmiş' veya 'işaretlenmemiş' halleriyle yapılabilir. İşaretleyici kullanılan durumlarda, işaretleyici, bileşiğin yapısı hakkında en fazla bilgiyi sağlayacak şekilde yerleştirilmelidir.

1.5. Kalite kriterleri

Yok.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

Hazırlıklar

Sağlıklı, genç ve yetişkin hayvanlar testten en az beş gün öncesinden laboratuvar koşullarına alıştırılırlar. Test öncesinde, hayvanlar muamele gruplarına rastgele ayrılır ve tayin edilir. Özel durumlarda, çok genç, hamile veya önceden muamele edilmiş hayvanlar kullanılabilir.

Test koşulları

Deney hayvanları

Toksikokinetik çalışmaları bir veya daha fazla uygun hayvan türünde uygulanabilir ve kullanılan türler dikkate alınarak veya aynı test maddesi üzerindeki diğer toksisite çalışmalarında kullanılması tasarlanabilir. Testte kemirgenler kullanıldığında ağırlık değişimi ortalama ağırlığın %20'sini geçmemelidir.

Sayı ve cinsiyet

Absorbsiyon (emilim) ve atılımla ilgili çalışmalar için, başlangıçtaki her bir doz grubunda dört hayvan olmalıdır. İki cinsten biri kullanılabilir fakat bazı durumlarda her iki cinsiyetin de çalışılması gerekir. Cevaplarda cinsiyete bağlı farklılıklar varsa, o zaman her iki cinsiyetten de dört hayvan test edilmelidir. Çalışmaların kemirgen olmayan hayvanlarla yürütüldüğü durumlarda daha az hayvan kullanılabilir.

Dokulardaki dağılımının çalışıldığı durumlarda, zamana bağlı her bir noktadaki gözden çıkarılacak hayvan sayısı ve incelenecek zamana bağlı noktaların sayısı için başlangıçtaki grup büyüklüğü dikkate alınmalıdır.

Metabolizma çalışılmaya başlandığında, grup büyüklüğü çalışmanın ihtiyaçlarına bağlıdır.

Çoklu doz ve çoklu-zaman nokta çalışmaları için, zamana bağlı noktaların sayısı ve planlı sonlandırmalar için grup büyüklüğü dikkate alınmalıdır, fakat gruplar en az iki hayvandan oluşmalıdır. Grup büyüklüğü test maddesinin ve/veya metabolitinin alımının, ayarının (plato) ve tükenmesinin (uygunsa) kabul edilebilir şekilde açıklanabilmesini sağlamalıdır.

Doz

Tekli doz uygulama durumlarında en az iki doz kullanılmalıdır. Düşük dozda hiçbir toksik etki gözlenmemelidir, yüksek dozda ise toksikokinetik parametrelerinde değişiklikler olabilir veya toksik etkiler meydana gelebilir.

Tekrarlı doz uygulamalarında düşük doz uygulanması genellikle yeterlidir fakat bazı durumlarda yüksek doz kullanılması da gerekebilir.

Yönetim planı

Toksikokinetik çalışmalar, diğer toksisite çalışmaları için kullanılmışsa veya kullanılacaksa test maddesi aynı taşıyıcı kullanılarak uygulanmalıdır. Test maddesi deney hayvanlarına belirli sürelerle genellikle oral yolla sonda ile besleme veya diyetle uygulanır veya denek hayvan gruplarında, tanımlanan sürelerde solunum yoluyla uygulanabilir. Test maddesinin damar içine uygulaması diğer yollarla gerçekleşen bağıl absorpsiyonun belirlenmesinde faydalı olabilir. İlaveten, maddenin damar içine uygulanmasından hemen sonra dağılımıyla ilgili faydalı bilgiler sağlanabilir.

Taşıyıcının test maddesiyle etkileşmesi olasılığı dikkate alınmalıdır.

Test maddesinin sonda ile besleme veya diyetle uygulanması arasındaki absorpsiyon farklılıklarına ve özellikle test maddesi diyetle verildiğinde dozun doğru şekilde tayin edilmesi gerekliliğine dikkat edilmelidir

Gözlem süresi

Tüm hayvanlar günlük olarak gözlemlenerek toksisite belirtileri ve başlama zamanı, derece ve süre gibi ilgili diğer klinik özellikler kaydedilir.

İşlem

Test hayvanları tartıldıktan sonra, test maddesi uygun bir yolla uygulanır. Gerekli görüldüğünde, hayvanlar test maddesi uygulanmadan önce aç bırakılabilirler.

Absorpsiyon

Uygulanan test maddesinin absorpsiyon alanı ve hızı çeşitli yöntemler kullanılarak referans gruplarıyla birlikte ve referans gruplar olmadan, değerlendirilebilir[1]

örneğin:
-idrar gibi vücut atığı, safra, feçes, solunan hava ve iskelet yapısındaki test maddesinin ve/veya metabolitinin miktarının tayin edilmesi
-test ve kontrol ve/veya referans grupları arasındaki biyolojik cevabın (ör. akut toksisite çalışmaları) karşılaştırılması,
-test ve referans gruplarında böbrek yoluyla atılan maddenin ve/veya metabolitinin miktarlarının karşılaştırılması,
-test maddesinin plazma seviyesi/zaman eğrisi altında kalan alanın belirlenmesi ve/veya referans grup verileriyle karşılaştırılması.

Dağılım

Başlangıçta iki yaklaşım söz konusudur, dağılım örneklerinin analizleri için biri ya da ikisi birden kullanılabilir:

- tüm otoradyografik teknikler kullanılarak faydalı nicel bilgilerin elde edilmesi ,
-hayvanları maruz kaldıktan sonrasındaki çeşitli zamanlarda gözden çıkararak nitel bilgi elde edilmesi ve test maddesinin ve/veya metabolitinin organ ve dokulardaki miktarı.

Atılım

Atılımla ilgili çalışmalarda, idrar, feçes ve solunan hava ve bazı durumlarda safra toplanır. Bu atıklardaki test maddesinin ve/veya metabolitinin miktarı maruz kaldıktan sonra çeşitli zamanlarda uygulanan dozun % 95'i atılıncaya kadar veya yedi gün için, hangisi daha önce gelirse, ölçülmelidir.
Özel durumlarda süt veren test hayvanlarının sütünde test maddesinin atılımı göz önünde bulundurulmalıdır.

Metabolizma

Metabolizmanın düzeyi ve yolu belirlenirken biyolojik numuneler uygun tekniklerle analiz edilmelidir. Metabolitlerin yapıları açıklanmalıdır ve daha önceki toksikolojik çalışmalarda ortaya çıkan soruların cevaplanması için uygun metabolik yollar önerilmelidir. Metabolik yollarla ilgili bilgi edinmek için çalışmaların in vitro yürütülmesi faydalı olabilir.

Metabolizma-toksisite arasındaki ilişkiye dair daha fazla bilgi, metabolize eden enzim sistemlerindeki etkinin belirlenmesi, iç sebeplerden kaynaklanan, protein olmayan sülfidril

---

[1]Bu yöntemde referans grup, içinde test maddesinin dozun tamamıyla biyo kullanılabilirlik sağlayan başka bir yolla uygulandığı gruptur.

bileşiklerinin tüketilmesi ve maddenin makromoleküllere (büyük molekül) bağlanması gibi biyokimyasal çalışmalarla elde edilebilir.

2. VERİLER

Yürütülen çalışmanın türüne bağlı olarak, veriler uygun yerlerde grafiklerle de desteklenerek çizelge halinde özetlenmelidirler. Her bir test grubu için mümkün ise zaman, dozaj ve dokular ve organlara bağlı ölçümlerin ortalama ve istatistiksel değişkenleri uygun olduğunda gösterilmelidir. Absorpsiyon ve atılım hızlarının miktarı uygun yöntemlerle belirlenmelidir. Metabolizma çalışmaları yürütüldüğünde; tanımlanan metabolitlerin yapıları verilmeli ve olası metabolik yollar gösterilmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Yürütülen çalışmanın türüne bağlı olarak, test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- türler, ırk, kaynak, çevresel koşullar, beslenme şekli;
- kullanılan işaretlenmiş maddelerin sınıflandırılması;
- dozaj seviyeleri ve kullanılan aralıklar,
- uygulama yolları/yolu ve kullanılan herhangi bir taşıyıcı;
- toksisite ve gözlenen diğer etkiler;
- solunan hava dahil, biyolojik örneklerdeki test maddesinin ve/veya metabolitlerin tayin edilmesi için yöntemler
- ölçümlerin cinsiyet, doz kürü, süre, dokular ve organlara göre ölçümlerin çizelgesi,
- absorpsiyon ve atılım miktarı ve zamanı
- biyolojik örneklerdeki metabolitlerin belirlenmeleri ve sınıflandırılmaları için yöntemler,
- metabolizmayla ilgili biyokimyasal ölçüm yöntemleri,
- metabolizma için önerilen yollar,
- sonuçların tartışılması,
- sonuçların yorumlanması.

3.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

4. KAYNAKLAR

Bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

B. 37. ORGANOFOSFORLU MADDELERE AKUT MARUZ KALMANIN ARDINDAN GECİKMİŞ NÖROTOKSİSİTE ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Maddenin toksik etkileri ele alınırken ve değerlendirilirken, belli sınıflardaki maddelerin diğer toksisite çalışmalarıyla belirlenemeyen özgün nörotoksisite türlerine neden olma potansiyellerinin üzerinde düşünmek önemlidir. Belli organofosforlu maddelerin gecikmiş nörotoksisiteye neden olduğu gözlenmiştir ve bu maddeler değerlendirme için aday olarak düşünülmelidir.

In vitro tarama testlerigecikmiş polinöropatiye (sinir sistemi hastalığı) neden olan maddeleri tanımlamak için uygulanır, ancak, in vitro çalışmalardan elde edilen negatif sonuçlar test maddesinin nörotoksikan (sinir sistemini etkileyen zehirli madde) olmadığının kanıtı değildir.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Organofosforlu maddeler yüksüz organofosfor esterleri, tiyoesterler veya organofosforik, organofosfonik veya organofosforamidik asitlerin anhidritleri veya ilgili fosforotiyoik, fosfonotiyoik veya fosforotiyoamidik asitler veya bazen bu grup arasında rastlanan, gecikmiş nörotoksisiteye neden olan diğer maddeleri içine alır.

Gecikmiş nörotoksisite: uzun süreli gecikmiş ataksi (adalelerde uyum bozukluğu) başlangıcı, omurilik ve periferal sinirlerde distal aksonopatiler ve sinir dokularında nöropati hedef esterazın (NTE) inhibasyonu ve yaşlanması ile beraber görülen bir hastalık tablosudur.

1.3. Referans maddeler

Bir referans madde laboratuardaki test koşulları altında test edilen türlerin cevaplarının önemli ölçüde değişmediğini göstermek amacıyla pozitif kontrol grubuyla test edilebilir.

Yaygın olarak kullanılan nörotoksikanlardan biri tri-o-tolil fosfattır (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS isimlendirme: fosforik asit, tris(2–metilfenil)ester) ayrıca tris–o–krezilfosfat olarak da bilinir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Test maddesi mümkünse tek doz olarak akut kolinerjik etkilerden korunan evcil dişi kuşlara oral yolla uygulanır. Hayvanlar, davranış anomalileri, ataksi ve felç için 21 gün boyunca gözlenirler. Biyokimyasal ölçümler,özellikle nöropati hedef esteraz inhibasyonu (NTE), her gruptan rastgele seçilen dişi kuşlar dozun uygulanmasından normalde 24 ve 48 saat sonra alınırlar. Maruz kalmadan yirmi bir gün sonra kalan dişi kuşlar öldürülür ve alınan sinir dokular histopatolojik incelemelere tabi tutulur.

1.5. Test yönteminin tanımı

1.5.1. Hazırlıklar

Virüsün yol açtığı hastalıklar ve tıbbi tedavisi olmayan, yürüyüşünde anomali bulunmayan sağlıklı, genç, erişkin dişi kuşlar rastgele seçilirler ve kontrol ve test grubu olarak ayrılırlar ve çalışmanın başlamasından beş gün önceden laboratuvar şartlarına alıştırılırlar.

Kafesler dişi kuşlar rahat hareket etmesini sağlayacak genişlikte olmalıdır ve yürüyüşleri kolayca gözlenebilmelidir.

Test maddesiyle doz uygulanması normalde oral gavaj ile, jelatin kapsüller veya karşılaştırılabilir bir yöntem kullanılarak uygulanır. Sıvılar seyreltilmemiş olarak veya mısır yağı gibi uygun bir taşıyıcıda çözünerek verilebilirler; mümkünse, katıların büyük dozları jelatin kapsül içinde yeterince absorblanamayacağı için, katılar çözülmelidir. Sulu olmayan taşıyıcılar için, taşıyıcının toksik etkisi bilinmelidir, bilinmiyorsa da testten önce belirlenmelidir.

1.5.2. Test koşulları

1.5.2.1. Test hayvanları

8-12 aylık, genç ergen yumurtlayan evcil dişi kuş (Gallus gallus domesticus) tavsiye edilir. Standart büyüklükteki cins ve türler kullanılmalıdır ve kuşlar normalde rahat hareket sağlayan koşullarda yetiştirilmelidir.

1.5.2.2. Sayı ve cinsiyet

Test grubuna ek olarak, hem taşıyıcı kontrol grubu hem de pozitif kontrol grubu kullanılmalıdır. Taşıyıcı kontrol grubu, test maddesinin uygulanmasının gözardı edildiği durumlar haricinde uygulama grubuyla aynı şekilde muamele edilmelidir.

Her bir grup için yeterli sayıda dişi kuş kullanılmalıdır böylece biyokimyasal belirlemeler için en az altı (her bir işaret zamanı için üç adet) hayvan öldürülebilir ve altı hayvan da testsonrasındaki patolojik inceleme amaçlı 21-günlük gözlem süresi içinde sağ kalır.

Pozitif kontrol grubu eş zamanlı olarak yürütülebilir veya yakın geçmişe dayalı bir grup olabilir. Pozitif kontrol grubu, bilinen bir gecikmiş nörotoksikanla muamele edilmiş en az altı dişi kuş içermelidir, hayvanlardan üçü biyokimya, üçü de patoloji içindir. Daha önceki verilerin periyodik olarak güncellenmesi tavsiye edilir. Testin yürütüldüğü laboratuvarda bazı önemli unsurların (ör. ırk, beslenme, barınma koşulları) değiştirildiği durumlarda, yeni pozitif kontrol verileri geliştirilmelidir.

1.5.2.3. Doz

Yeterli sayıda dişi kuş ve doz grubu kullanılan bir ön çalışma, asıl çalışmada kullanılacak olan düzeyi belirlemek için uygulanmalıdır. Bu ön çalışmada ölüm meydana gelmesi asıl çalışma dozunun doğru olarak belirlenmesi için gereklidir. Ancak, akut kolinerjik etkiye bağlı ölümleri önlemek için atropin veya gecikmiş nörotoksik cevapla etkileşmediği bilinen başka

bir koruyucu madde kullanılabilir. Test maddesinin maksimum öldürücü olmayan dozunu tahmin etmek için çeşitli yöntemler kullanılabilir (bakınız yöntem B.1bis).

Dişi kuşla ilgili geçmişe dayalı veriler veya diğer toksikolojik bilgiler de doz seçimi için faydalı olabilir.

Test maddesinin asıl çalışmadaki doz, doz seçimi için yapılan ön çalışmadaki sonuçlar dikkate alınarak olabildiğince yüksek olmalıdır, bunun için üst sınır 2,000 mg/kg vücut ağırlığıdır. Meydana gelebilecek bir ölüm, 21 günde biyokimya (altı) ve histopatoloji(altı) için yeter sayıdaki hayvanların hayatta kalmalarını etkilememelidir. Akut kolinerjik(uçlarında asetilkolin açığa çıkan) etkiye bağlı ölümleri önlemek için atropin veya gecikmiş nörotoksik cevapla etkileşmediği bilinen başka bir koruyucu madde kullanılmalıdır.

1.5.2.4. Sınır testi

Bu çalışma için tanımlanan işlemler kullanılarak uygulanan 2000 mg/kg vücut ağırlığı/gün doz seviyeli bir sınır testi gözlenebilen herhangi bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve yapısal olarak benzer maddelerle ilgili toksisite beklenmiyorsa bu durumda daha yüksek doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. Beklenen insan maruz kalması daha yüksek doz kullanılması gerektiğine işaret etmedikçe, sınır testi uygulanır.

1.5.2.5. Gözlem süresi

Gözlem süresi 21 gün olmalıdır.

1.5.3. İşlem

Akut kolinerjik etkiye bağlı ölümü önlemek amacıyla koruyucu madde uygulandıktan sonra, test maddesi tek doz olarak uygulanır.

1.5.3.1. Genel gözlemler

Gözlemlere maruz kalma işleminden hemen sonra başlanmalıdır. Tüm dişi kuşlar ilk 2 gün boyunca birkaç defa ve sonrasında günde en az bir defa 21 gün boyuca veya planlanan öldürme zamanına kadar dikkatlice gözlenmelidirler. Davranışsal bozuklukların başlama zamanı, türü, şiddeti ve süresi gibi tüm toksisite belirtileri kaydedilmelidir. Sıralı dereceli bir ölçekte en az dört dozda ataksi ölçülmelidir ve felç not edilmelidir. Haftada en az iki defa dişi kuşlar kafesin dışına alınmalı ve toksik etkilerin gözlenebilmesini kolaylaştırmak için bir süre merdiven tırmanmak gibi zorlanmış hareket ettirici hareketlere tabi tutulmalıdır. Ölmek üzere (Moribund) olan hayvanlarla şiddetli acı ve ağrı çeken hayvanlar bu durumun farkına varıldığında uzaklaştırılıp, insanca öldürülmeli ve hayvanlara otopsi (nekropsi) yapılmalıdır.

1.5.3.2. Vücut ağırlığı

Bütün dişi kuşlar test maddesi uygulanmadan hemen önce ve uygulama sonrasında da haftada en az bir kere tartılmalıdır.

1.5.3.3. Biyokimya

Her bir muamele ve taşıyıcı kontrol grubundan rastgele seçilen altı dişi kuş ve pozitif kontrol grubundan üç dişi kuş doz uygulandıktan sonra birkaç gün içinde öldürülmelidir ve hazırlanan, beyin ve bel omuriliği, nöropati hedef esteraz (NTE) inhibasyon için test edilir. Ek olarak, siyatik sinir dokunun da, nöropati hedef esteraz (NTE) inhibasyon aktivitesi için hazırlanması ve analiz edilmesi faydalı olabilir. Normalde kontrol grubundan ve her bir muamele grubundan üç hayvan 24 saat sonra ve son üç tane de dozun uygulanmasından 48 saat sonra öldürülür. Zehirlenmenin klinik belirtilerinin gözlenmesi (bu durum sıklıkla kolinerjik belirtilerin başlangıç zamanının gözlenmesi vasıtasıyla değerlendirilir) bu toksik ajanın vücuttan çok yavaş atılabildiğine işaret ederse, bu durumda üç kuştan her kuş için iki defa olmak üzere 24 saat ile en geç 72 saat arasında örnek alınması tercih edilebilir.

Uygun olduğu düşünülüyorsa, bu örnekler üzerinde ayrıca asetilkolinesteraz (AChE) analizi de yürütülebilir. AChE'nin in vivo kendiliğinden etkinleşmesi gerçekleşebilir ve böylece maddenin AChE inhibitörü olma potansiyeli göz ardı edilir.

1.5.3.4. Tam teşekküllü otopsi

Tüm hayvanların otopsisi beyin ve omuriliğin görünümlerinin gözlenmesini de içine alır.

1.5.3.5. Histopatolojik inceleme

Biyolojik inceleme için kullanılmayacak olan ve gözlem süresinde sağ kalan hayvanlardan alınan sinir doku mikroskop altında incelenmelidir. Dokular perfüzyon (üzerine sıvama) teknikleri kullanılarak doğal durumlarında (in situ) sabitlenmelidir. Kesitler beyincik, medulla oblongata, omurilik ve periferal sinirleri kapsar. Omurilik, üst boyun kesiminden, orta göğüs ve kuyruk sokumu bölgelerinden alınmalıdır. Kaval kemiği sinirlerinin distal bölgesinin kesiti ve baldır ikiz kaslarına uzanan dalları ve kalça sinirlerinin kesiti alınmalıdır. Kesitler miyelin ve aksona- özgü uygun boyalarla boyanmalıdır.

2. VERİLER

Bu yöntemde seçilen, sonlanma noktalarındaki negatif sonuçlar (biyokimya, histopatoloji ve davranışsal gözlem) normalde gecikmiş nörotoksisite için daha fazla teste ihtiyaç duymaz. Bu sonlanma noktaları için şüpheli ya da uyumsuz olan sonuçların ayrıca değerlendirilmesi gerekir.

Veriler ayrı ayrı sağlanmalıdır. Ek olarak, tüm veriler her bir test grubu için hayvan sayısını, doku bozulmalarının, davranışsal ve biyokimyasal etkileri, bu etkilerin ve doku bozulmalarının türünü ve şiddetini ve her türde ve şiddette doku bozulması hayvan sayısını gösteren çizelge halinde özetlenmelidir.

Bu çalışmadaki bulgular davranışsal, biyokimyasal ve histopatolojik etkilerin sıklığı, şiddeti ve ilişkisi ve muamele ve kontrol gruplarında gözlenen diğer etkilerle ilgili olarak değerlendirilmelidir.

Rakamsal sonuçlar uygun ve genellikle kabul görmüş istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmelidirler. İstatistiksel yöntemler çalışma tasarlanırken belirlenmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk;
- hayvanların, yaşı;
- kaynak, barınma koşulları, vs.;
- hayvanların ayrı ayrı testin başındaki ağırlıkları

Test koşulları:
- uygun yerlerde, test maddesinin hazırlanması, kararlılığı ve homojeniği ile ilgili detaylar;
- taşıyıcı seçimi için gerekçe
- test maddesinin uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar.
- doz seçimi için gerekçe;
- taşıyıcıyla ilgili detaylar, uygulanan maddenin hacmi ve fiziksel şekli dâhil uygulanan dozların özelliği;
- koruyucu maddenin kimliği ve ilgili detaylar

Sonuçlar:
- vücut ağırlığı verileri;
- ölüm dâhil, grup-toksik cevap verileri;
- klinik gözlemlerin doğası, şiddeti ve uzunluğu (tersinir olup olmadıkları);
- biyokimyasal yöntemlerin ve bulguların detaylı tanımları;
- otopsi(nekropsi) bulguları;
- histopatolojik bulguların detaylı tanımı;
- uygun yerlerde sonuçların istatistiksel uygulamaları
- Sonuçların tartışılması.
- Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

Bu yöntem OECD TG 418'e eşdeğerdir.

B. 38. ORGANOFOSFORLU MADDELERİN GECİKMİŞ NÖROTOKSİSİTESİ-TEKRARLI DOZ ÇALIŞMASI 28 GÜN

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Maddelerin toksik etkileri ele alınırken ve değerlendirilirken, belirli madde sınıflarının diğer toksisite çalışmalarıyla belirlenemeyen özgün nörotoksisite türlerine neden olma potansiyelleri dikkate alınmalıdır. Belli organofosforlu maddelerin gecikmiş nörotoksisiteye neden olduğu gözlenmiştir ve bu maddeler değerlendirme için aday olarak düşünülmelidir.

In vitro tarama testleri gecikmiş polinöropatiye neden olan maddeleri tanımlamak için uygulanır ancak in vitro çalışmalardan elde edilen negatif sonuçlar test maddesinin nörotoksik madde olmadığının kanıtı değildir.

28 gün gecikmiş nörotoksisite testi sınırlı bir süre içinde, tekrarlı maruz kalma sonucu ortaya çıkabilecek olası sağlık zararları hakkında bilgi sağlar. Doz-cevap ilişkisi hakkında bilgi ve maruz kalma için güvenlik kriterlerinin oluşturulmasında kullanılacak olan olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviyenin tahmin edilmesini sağlar.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Organofosforlu maddeler yüksüz organofosfor esterleri, tiyoesterler veya organofosforik, organofosfonik veya organofosforamik asitlerin anhidritleri veya ilgili fosforotiyoik, fosfonotiyoik veya fosforotiyoamidik asit veya bazen bu grup arasında rastlanan, gecikmiş nörotoksisiteye neden olan diğer maddeleri içine alır.

Gecikmiş nörotoksisite uzun süreli gecikmiş ataksi başlangıcı, omurilik ve periferal sinirlerde distal aksonopatiler ve sinir dokularında nöropati hedef esterazın (NTE) engellemesi ve eskimesi ile beraber görülen bir sendromdur.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Maddenin günlük dozları ağız yoluyla yerli dişi kuşlara 28 gün boyunca uygulanır. Hayvanlar en azından her gün davranış anomalileri, ataksi ve paraliziçin son dozdan sonraki 14. güne kadar gözlenirler. Biyokimyasal ölçümler, özellikle nöropati hedef esteraz engellenmesi (NTE), her gruptan rastgele seçilen kuşlardan son dozun uygulanmasından normalde 24 ve 48 saat sonra alınırlar. Maruz kalmadan iki hafta sonra kalan kuşlar öldürülür ve alınan sinir dokular histopatolojik incelemelere tabi tutulur.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hazırlıklar

Viral hastalığı bulunmayan, ilaç verilmeyen, yürüyüşünde anomali bulunmayan sağlıklı, genç, erişkin dişi kuşlar rastgele seçilirler ve kontrol ve muamele grubu olarak ayrılırlar ve çalışmanın başlamasından en az beş gün önce laboratuvar şartlarına alıştırılırlar.

Kafesler kuşların rahat hareket etmesini sağlayacak genişlikte olmalıdır ve yürüyüşleri kolayca gözlenebilmelidir.

Oral yolla haftada 7 gün boyunca doz uygulanır tercihen sonda kullanarak veya jelâtin kapsülle verilir. Sıvılar seyreltilmemiş olarak veya mısır yağı gibi uygun bir taşıyıcıda çözünerek verilebilirler, eğer mümkünse, katıların büyük dozları jelâtin kapsül içinde yeterince absorblanamayacağı için katılar çözülmelidir. Sulu olmayan taşıyıcılar için, taşıyıcının toksik özellikleri bilinmelidir, bilinmiyorsa da testten önce belirlenmelidir.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Test hayvanları

8–12 aylık, genç ergen yumurtlayan evcil kuşlar (Gallus gallus domesticus) tavsiye edilir. Standart büyüklükteki cins ve türler kullanılmalıdır ve kuşlar normalde rahat hareket sağlayan koşullarda yetiştirilmelidir.

1.4.2.2. Sayı ve cinsiyet

Genellikle üç muamele grubu ve bir taşıyıcı kontrol grubu kullanılmalıdır. Taşıyıcı kontrol grubu test maddesi verilmeden, uygulama grubuyla aynı şekilde muamele edilmelidir.

Her bir kuş grubu için yeterli sayıda kuş kullanılmalıdır böylece biyokimyasal belirlemeler için en az altı (her iki zamanlamasında için üç adet) kuş öldürülebilir ve altı kuş da muamele sonrasındaki patolojik inceleme amaçlı 14-günlük gözlem süresi içinde sağ kalır.

1.4.2.3. Doz

Dozlar gecikmiş nörotoksisiteyle ilgili akut test sonuçları ve test bileşiğiyle ilgili mevcut diğer toksisite ve kinetik verileri dikkate alınarak seçilmelidir. En yüksek doz toksisite etkileri tercihen nörotoksisiteyi uyarmak amacıyla seçilmelidir ancak ne ölümü ne de belirgin rahatsızlıkları indüklemesi beklenmez. Bundan sonra doza bağlı cevabı ve en düşük dozda, hiçbir olumsuz etkinin gözlemlenmediği düzeyi gösteren azalan dizi halindeki doz grupları seçilmelidir.

1.4.2.4. Sınır testi

Eğer bu çalışma için tanımlanan işlemler kullanılarak uygulanan 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün doz seviyeli bir sınır testi gözlenebilen herhangi bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve eğer yapısal olarak benzer maddelerle ilgili verilere dayanılarak toksisite beklenmiyorsa bu durumda daha yüksek doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya

gerek olmayabilir.Beklenen insan maruz kalması daha yüksek doz kullanılması gerektiğine işaret etmedikçe, sınır testi uygulanır.

1.4.2.5. Gözlem süresi

Tüm hayvanlar maruz kalma süresi ve sonraki 14 gün boyunca, günlük olarak, planlanan otopsi zamanına kadar gözlenirler.

1.4.3. İşlem

Hayvanlara 28 gün boyunca haftada yedi gün test maddesi uygun dozda uygulanır.

1.4.3.1. Genel gözlemler

Gözlemler uygulamadan hemen sonra başlamalıdır. Tüm kuşlar günde en az bir defa 28 günlük muamele süresince ve doz uygulanmasından sonraki 14 gün boyunca veya planlanan öldürme zamanına kadar dikkatlice gözlenmelidirler. Başlama zamanı, türü, şiddeti ve süresi dâhil tüm toksisite belirtileri kaydedilmelidir. Gözlemlere davranış bozuklukları dâhil olmalı ancak gözlemler bununla sınırlı olmamalıdır. Sıralı dereceli bir ölçekte en az dört dozda ataksi (adalelerde uyum bozukluğu) ölçülmelidir ve paraliz (felç) not edilmelidir. Haftada en az iki defa kuşlar kafesin dışına alınmalı ve minimum toksik etkilerin gözlenebilmesini kolaylaştırmak için bir süre merdiven tırmanmak gibi zorlanmış motor hareketlerine tabi tutulmalıdır. Ölmek üzere olan hayvanlarla şiddetli acı ve ağrı çeken hayvanlar bu durumun farkına varıldığında uzaklaştırılıp, insanca öldürülmeli ve hayvanlara otopsi yapılmalıdır.

1.4.3.2. Vücut ağırlığı

Bütün kuşlar test maddesinin ilk uygulamasından hemen önce ve uygulama sonrasında da haftada en az bir kere tartılmalıdır.

1.4.3.3. Biyokimya

Her bir muamele ve taşıyıcı kontrol grubundan rastgele seçilen altı kuşlar doz uygulandıktan sonra birkaç gün içinde öldürülmelidir ve hazırlanan, beyin ve bel omuriliği nöropati hedef esteraz (NTE) engelleme etkinliği için test edilir. Ek olarak, siyatik sinir dokununda nöropati hedef esteraz (NTE) engelleme etkinliği için hazırlanması ve analiz edilmesi faydalı olabilir. Normalde kontrol grubundan ve her bir muamele grubundan üç hayvan 24 saat sonra üç tane de son dozun uygulanmasından 48 saat sonra öldürülür. Eğer akut toksisite veya diğer çalışmalardan (ör.toksikokinetik) elde edilen veriler son dozun uygulanmasından sonraki diğer öldürme zamanlarının tercih edilebilir olduğuna işaret ederse, bu zamanlar kullanılmalı ve bunun için gerekçe sunulmalıdır.

Eğer uygun olduğu düşünülüyorsa, bu örnekler üzerinde ayrıca asetilkolinesteraz (AChE) analizi de yürütülebilir. AChE'nin in vivo çalışmasında kendiliğinden etkinleşmesi gerçekleşebilir ve böylece maddenin AChE inhibitörü olma potansiyeli göz ardı edilir.

1.4.3.4. Kapsamlı otopsi

Tüm hayvanların otopsisi beyin ve omuriliğin görünümlerinin gözlenmesini de içine alır.

1.4.3.5. Histopatolojik inceleme

Biyolojik inceleme için kullanılmayacak olan ve gözlem süresinde sağ kalan hayvanlardan alınan sinir doku mikroskop altında incelenmelidir. Dokular perfüzyon teknikleri kullanılarak in situ sabitlenmelidir. Kesitler beyincik medulla oblongata, omurilik ve periferal sinirleri kapsar. Omurilik üst boyun kesimden, orta göğüs ve kuyruk sokumu bölgelerinden alınmalıdır. Kaval kemiği sinirlerinin distal bölgesinin kesiti ve baldır ikiz kaslarına uzanan dalları ve kalça sinirlerinin kesiti alınmalıdır. Kesitler miyelin ve aksona- özgü uygun boyalarla boyanmalıdır.

Başlangıç olarak, mikroskobik incelemeler kontrol grubu ve yüksek doz grubundaki tüm hayvanlardan elde edilen dokularda yürütülmelidir. Yüksek doz grubunda etkilere dair kanıtlar varsa, mikroskobik inceleme ara ve düşük doz gruplarındaki hayvanlar için de ayrıca yürütülmelidir.

2. VERİLER

Bu yöntemde seçilen sonlanma noktalarındaki negatif sonuçlar için (biyokimya, histopatoloji ve davranışsal gözlem) normalde daha fazla gecikmiş nörotoksisite testine ihtiyaç duyulmaz. Bu sonlanma noktaları için şüpheli ya da uyumsuz olan sonuçların ayrıca değerlendirilmesi gerekebilir.

Her bir veri ayrı ayrı sağlanmalıdır. Ek olarak, tüm veriler her bir test grubu için hayvan sayısını, doku bozulmalarına, davranışsal ve biyokimyasal etkileri, bu etkilerin ve doku bozulmalarının türünü ve şiddetini ve her türde ve şiddette doku bozulması gösteren hayvan sayısını gösteren çizelge halinde özetlenmelidir.

Bu çalışmadaki bulgular davranışsal, biyokimyasal ve histopatolojik etkilerin sıklığı, şiddeti ve ilişkisi ve muamele ve kontrol gruplarında gözlenen diğer etkilerle ilgili olarak değerlendirilmelidir.

Rakamsal sonuçlar uygun ve genellikle kabul görmüş istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmelidirler. İstatistiksel yöntemler çalışma tasarlanırken belirlenmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, mümkünse, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı;
- kaynak, barınma koşulları, vs.;
- hayvanların ayrı ayrı testin başlangıcındaki ve testin sonundaki ağırlıkları.

Test koşulları:

- uygun yerlerde, test maddesinin hazırlanması, kararlılığı ve homojenliğiyle ilgili detaylar;
- taşıyıcı seçimi için gerekçe
- test maddesinin uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar.
- doz seçimi için gerekçe;
- taşıyıcıyla ilgili detaylar, uygulanan maddenin hacmi ve fiziksel şekli dahil uygulanan dozların özelliği;
- biyokimyasal belirleme zamanları 24 veya 48 saatten farklı seçilmişse bu seçim için gerekçe.

Sonuçlar:

- vücut ağırlığı verileri;
- ölüm dâhil, doz-toksisite cevap verileri;
- olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviye;
- klinik gözlemlerin doğası, şiddeti ve uzunluğu (tersinir olup olmadıkları);
- biyokimyasal yöntemlerin ve bulguların detaylı tanımları;
- otopsi bulguları;
- histopatolojik bulguların detaylı tanımı;
- uygun yerlerde sonuçların istatistiksel uygulamaları.

Sonuçların tartışılması

Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

Bu yöntem OECD TG 419'a eşdeğerdir.

B.39. MEMELİ KARACİĞER HÜCRELERİNDE IN VIVO PROGRAMLANMAMIŞ DNA SENTEZİ (UDS) TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 486, Memeli Karaciğer Hücrelerinde in vivo Programlanmamış DNA Sentezi (UDS) Testi (1997) 'ne eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Memeli Karaciğer Hücrelerinde in vivo Programlanmamış DNA Sentezi (UDS) Testi'nin amacı uygulama yapılan hayvanların karaciğer hücrelerinde DNA onarımını uyaran test maddelerinin tespit edilmesidir (bakınız 1,2,3,4).

Bu in vivo test, kimyasalların karaciğer üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılmasını sağlar. Ölçülen son nokta, karaciğerdeki DNA hasarının ve sonrasındaki onarımın göstergesidir. Karaciğer absorblanan bileşiklerin metabolizması için temel organdır. Bu yüzden DNA hasarının in vivo ölçülmesi için de uygundur.

Eğer test maddesinin hedef dokuya ulaşamayacağı düşünülüyorsa, bu testin kullanılması uygun değildir.

Programlanmamış DNA sentezinin son noktası (UDS), planlı olarak (S fazı) DNA sentezine gitmeyen hücrelerdeki işaretli nükleozidlerin alımlarının belirlenmesiyle ölçülür. En yaygın olarak kullanılan teknik trityumla işaretlenmiş timidin (^{3}H-TdR) alımının otoradyografiyle belirlenmesidir. In vivo UDS testlerinde tercihen sıçan karaciğeri kullanılır. Karaciğer dokularından başkadokular da kullanılabilir, fakat bu testte yer almamaktadır.

Bir UDS cevabının tespit edilmesi, hasar yerinde çıkarılan ve yer değiştiren DNA bazlarının sayısına bağlıdır. Bu yüzden, UDS testi maddeyle uyarılmış uzun yama onarım (longpatch repair) (20–30 baz) tespitinde oldukça önemlidir. Tersine, kısa yama onarım (1–3 baz) daha az duyarlılıkla tespit edilir. Bundan başka, mutajenik olaylar, DNA hasarlarının onarılamaz, yanlış onarılmış veya yanlış eşleşmesine uğramış olmalarından kaynaklanabilir. UDS cevabının derecesi, onarım işleminin doğruluğu ve uygunluğu hakkında herhangi bir gösterge sunmaz. Ek olarak, şu da münkündür, mutajen DNA ile reaksiyona girer fakat DNA hasarı eksizyon (kesip çıkarma) onarım işlemiyle onarılmaz. UDS testiyle elde edilen mutajenik etkinlik ile ilgili bilgi eksikliği bu son noktanın potansiyel duyarlılığının belirlenebilmesiyle telafi edilmiştir çünkü son nokta tüm genom için ölçülmüştür.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Onarımdaki hücreler: Testin yürütüldüğü laboratuvarda önceden doğrulanmış olan değerden daha yüksek olan net nükleer granül (NNG)

Net nükleer granül (NNG): Otoradyografik UDS testlerindeki hücrelerin UDS etkinliklerinin nicel ölçümüdür, nükleer granül (NG) sayısından, çekirdek-eşdeğeri sitoplazmik alanlardaki ortalama sitoplazmik granül sayısının çıkarılmasıyla hesaplanır: NNG = NG - CG. NNG

sayımları her bir hücre için hesaplanır ve sonrasında kültürdeki, paralel kültürlerdeki vs. hücreler için bir araya getirilir.

Programlanmamış DNA Sentezi (UDS): Kimyasal maddelerle veya fiziksel ajanlarla uyarılmış hasarlı bölgenin DNA'dan çıkarılıp uzaklaştırılmasından sonraki DNA onarım sentezi.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Memeli karaciğeri in vivo UDS testi, kimyasal maddelerle veya fiziksel etkenlerle uyarılmış hasarlı bölgenin DNA'dan çıkarılıp uzaklaştırılmasından sonraki DNA onarım sentezine işaret eder. Test, genellikle ^{3}H-TdR'nin hücre döngüsünün S-fazındaki düşük frekanslı karaciğer hücrelerinin DNA'sına katılmasına dayanır. ^{3}H-TdR alımı genellikle otoradyografiyle belirlenir çünkü bu teknik S-fazından gelen etkileşimlere, örneğin sıvı sintilasyon sayımı kadar duyarlı değildir.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hazırlıklar

1.4.1.1. Hayvan türlerinin seçimi

Yaygın olarak sıçanlar kullanılır ancak diğer uygun memeli türleri de kullanılabilir. Genç, sağlıklı, erişkin hayvanların yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşları kullanılmalıdır. Deneyin başında, hayvanlardaki ağırlık değişkenliği aralığı her iki cins için de, uygun ortalama değerin % 20'sini geçmemelidir.

1.4.1.2. Barınma ve beslenme koşulları

Genel koşullar, Genel Giriş Kısım B'de belirtildiği şekilde uygulanır, nemlilik % 50–60 arasında olmalıdır.

1.4.1.3. Hayvanların hazırlanması

Sağlıklı genç yetişkin hayvanlar rastgele kontrol ve muamele gruplarına ayrılırlar. Kafesler yerleştirilmelerinden kaynaklanacak olası etkileri en az indirecek şekilde yerleştirilirler. Hayvanlar ayrı ayrı kimliklendirilirler ve kafeslerine, laboratuvar koşullarına alışmaları için en az beş gün önceden konulurlar.

1.4.1.4. Test maddesi / Hazırlıklar

Eğer uygunsa, hayvanlara doz uygulaması yapılmadan önce, katı test maddesi uygun çözücüler veya taşıyıcılar içinde çözülmeli veya askıda kalmalı ve seyreltilmelidir. Sıvı test maddeleri doğrudan doz verilebilir veya seyreltilebilirler. Kararlılıklarıyla ilgili veriler, saklanmasının uygun olduğunu göstermedikçe test maddesinin taze hazırlanmış olanları uygulanmalıdır.

1.4.2. Test koşulları

1.4.2.1. Çözücü/Taşıyıcı

Çözücü/taşıyıcı kullanılan doz seviyelerinde toksik etki meydana getirmemelidir ve test maddesiyle kimyasal reaksiyona gireceğinden şüphe duyulmamalıdır. Eğer çok iyi bilinen çözücüler/taşıyıcılar dışındakiler kullanılırsa, içerikleri uyumluluklarını gösteren verilerle desteklenmelidir. Uygun olan her yerde, sulu çözelti/taşıyıcının kullanılmasının düşünülmesi tavsiye edilir.

1.4.2.2. Kontroller

Deneyin bağımsız olarak uygulanan her bir bölümünde eş zamanlı pozitif ve negatif (çözücü veya taşıyıcı) kontroller olmalıdır. Test maddesiyle muamele haricinde, kontrol grubundaki hayvanlar, muamele grubundaki hayvanlarla eşit şartlarda tutulmalıdırlar.

Pozitif kontrollerin, arka planda tespit edilebilir artış sağlaması beklenen maruz kalma seviyelerinde uygulandığında, UDS oluşturması beklenir. Metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan pozitif kontroller, orta şiddette cevap ortaya çıkaran dozlarda kullanılmalıdır (4). Dozlar etkilerin açıkça görülebileceği şekilde seçilebilir, fakat işaretli lamların okuyucu tarafından hemen anlaşılabilmesini sağlamaz.

Pozitif kontrol madde örnekleri:

Örnekleme zamanları	Madde	CAS No.	EINECS No.
Erken örnekleme zamanları (2-4 saat)	N-Nitrozodimetilamin	62-75-9	200-249-8
Geç örnekleme zamanları (12-16 saat)	N-2-Florenilasetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Diğer uygun pozitif kontrol maddeleri kullanılabilir. Pozitif kontrolün test maddesinden farklı bir yolla uygulanması kabul edilebilir.

1.5. İşlem

1.5.1. Hayvanların sayı ve cinsiyeti

Test cevabındaki doğal biyolojik çeşitliliği dikkate almak adına yeterli sayıda hayvan kullanılmalıdır. Analiz edilecek hayvanların sayısı grup başına en az 3 olmalıdır. Geçmişe yönelik anlamlı bir veritabanının oluşturulduğu durumlarda, eşzamanlı negatif ve pozitif kontrol grupları için sadece 1 veya 2 hayvan yeterlidir.

Çalışma sırasında aynı türde yapılmış ve aynı uygulama yolunun kullanıldığı çalışmalara ait veriler varsa ve bu veriler cinsiyetler arasında toksisite açısından belirgin bir fark olmadığını gösteriyorsa, tek bir cinsiyetle, tercihen erkek hayvanlarla, testin uygulanması yeterli olacaktır. İnsanların kimyasallara maruz kalması bazı farmasötik maddeler için cinsiyete özgü olabilir, böyle durumlarda test uygun cinsiyetdeki hayvanla yürütülmelidir.

1.5.2. Uygulama planı

Test maddeleri genelde tek uygulama şeklinde verilirler.

1.5.3. Doz

Normalde en az iki doz kullanılır. En yüksek doz, toksisite belirtileri meydana getiren doz olarak tanımlanır öyle ki daha yüksek dozlarının aynı doz kürü uygulanarak ölüm meydana getirmesi beklenir. Genelde, daha düşük dozların yüksek dozun %25-50'si arasında olması beklenir.

Toksik olmayan dozlarda özel biyolojik aktivite gösteren maddeler (hormonlar, mitojenler) doz hazırlama kriterleri için istisna olabilir ve ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Eğer elde veri mevcut olmadığından bir aralık bulma çalışması uygulanırsa, bu uygulama asıl çalışmanın yapılacağı laboratuvarda, asıl çalışmada kullanılacak ırk, tür, ve doz kürü kullanılarak yapılmalıdır.

En yüksek doz ayrıca karaciğerde bazı toksisite belirtileri meydana getiren doz olarak da tanımlanabilir. (ör. piknotik çekirdekler)

1.5.4. Sınır testi

Eğer bir testten tek 2000 mg/kg vücut ağırlığı doz tek bir muamelede veya aynı günde iki muamelede uygulandığında, gözlenebilen herhangi bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve yapısal olarak ilgili maddelerden elde edilen verilere dayanılarak genotoksisite beklenmiyorsa bu durumda daha yüksek doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. İnsanda beklenen maruz kalma, sınır testinde daha yüksek doz kullanılması gerektiğine işaret edebilir.

1.5.5. Dozların uygulanması

Test maddesi genellikle gavaj yöntemi kullanılarak sonda ile beslemeyle veya mideye uygun bir elastik boru sokulmasıyla uygulanır. Diğer maruz kalma yolları da gerekçelendirildikleri takdirde kabul edilebilir olabilir. Ne var ki karın içine enjeksiyon yolu tavsiye edilmez çünkü madde dolaşım sistemine girmeden, karaciğer doğrudan maddeye maruz kalır. Sonda ile veya enjeksiyonla tek seferde uygulanabilecek maksimum sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim 2 ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir. Bundan daha büyük hacimlerin kullanılması gerekçelendirilmelidir. Normalde daha yüksek konsantrasyonlarda daha kötü etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için konsantrasyonun tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla test hacmindeki değişkenlik en aza indirilmelidir.

1.5.6. Karaciğer hücrelerinin hazırlanması

Karaciğer hücreleri doz uygulaması yapılan hayvanlardan normalde doz uygulanmasından 12–16 saat sonra hazırlanır. 12–16 saatte açık bir pozitif cevap olmadığı sürece ilave olarak daha öncesinde örnek alınması (normalde muameleden 2–4 saat sonra) gerekir. Ancak, alternatif örnek alma zamanları toksikokinetik verilere dayanılarak gerekçelendirildiği takdirde kullanılabilir.

Memeli karaciğer hücrelerinin kısa süreli kültürleri genellikle karaciğerin kollajenazla doğal durumda(in situ) perfüzyonuyla oluşturulur ve yeni ayrıştırılan karaciğer hücrelerinin uygun bir yüzeye tutunması sağlanır. Negatif kontrol hayvanlarından elde edilen karaciğer hücrelerinin yaşama kabiliyeti (5) en az yüzde 50 olmalıdır.

1.5.7. Programlanmamış DNA Sentezinin (UDS) Belirlenmesi

Yeni izole edilmiş memeli karaciğer hücreleri genellikle 3H-TdR içeren bir ortamda 3-8 saat gibi uygun bir zaman uzunluğunda inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda, fazladan işaretlenmemiş timidin içeren hücreler birleşik olmayan radyoaktiviteyi (soğuk izleme) azaltmak için ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Hücreler daha sonra durulanır, sabitlenir ve kurutulur. Daha da uzun inkübasyon süreleri için soğuk izleme gerekli olmayabilir. Lamlar otoradyografik emülsiyona daldırılır, karanlığa maruz bırakılırlar (7-14 gün buzdolabında saklanır), geliştirilir, boyanır ve maruz kalan gümüş granüller sayılır. Her bir hayvandan iki veya üç lam hazırlanır.

1.5.8. Analiz

Lam örnekleri, UDS'nin anlamlı değerlendirilmesini sağlayacak normal morfolojideki hücrelerden yeterince içermelidir. Örnekler açık şekilde görülen sitotoksisite belirtileri için mikroskobik olarak incelenirler. (ör. piknoz, düşük seviyede radyo işaretleyicili).

Lamlar granüllerin sayılmasından önce işaretlenirler. Normalde her bir hayvandan en az iki lam için 100 hücre sayılır, 100 hücre/hayvan'dan daha az sayımların gerekçesi belirtilmelidir. Granül sayımları S-fazı çekirdekleri için yapılmaz, fakat S-fazı hücrelerinin oranı kaydedilebilir.

Gümüş granüllerin birikmesiyle ortaya çıkan (morfolojik olarak normal olan hücrelerde ve çekirdeklerdeki)3H-TdR katılım miktarı uygun yöntemler kullanılarak belirlenmelidir.

Granül sayımları çekirdekler (nükleer granüller, NG) ve sitoplazmadaki çekirdek eşdeğeri alanlarda (sitoplazmik granüller, CG) üzerinden belirlenir. CG sayımları sitoplazmanın en yoğun işaretlenmiş alanı veya çekirdeğe bitişik rastgele iki veya üç sitoplazmik granül ortalaması alınarak ölçülür. Diğer sayma yöntemleri (ör.tam hücre sayımı) eğer gerekçelendirilirse, kullanılabilir (6).

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Ayrı ayrı lamlar ve hayvan verileri elde edilmelidir. Ek olarak, tüm veriler çizelge halinde özetlenmelidir. Net nükleer granül (NNG) sayımları her bir hücre, her bir hayvan ve her bir doz ve zaman için NG sayımlarından CG sayımları çıkartılarak hesaplanmalıdır. Eğer 'onarımdaki hücreler' sayılırsa, tanımlanma kriterleri doğrulanmalı ve geçmişe dayalı veya eşzamanlı negatif kontrol verilerine dayanmalıdır. Sayısal sonuçlar istatistiksel yöntemlerle değerlendirilebilir. Eğer kullanılmışsa, istatistiksel testler seçilmeli ve çalışma yürütülmeden önce gerekçelendirilmelidir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

pozitif/negatif cevapların kriterleri için örnekler:

pozitif

(i) geçmişe yönelik laboratuvar değerlerine göre doğrulanmış önceden hazırlanan değerlerin üzerindeki NNG değerleri veya

(ii) eş zamanlı kontrollerden anlamlı olarak büyük olan NNG değerleri,

negatif

(i) geçmişe yönelik kontrol eşik değerinin içinde/altında NNG değerleri, veya

(ii) eş zamanlı kontrollerden anlamsız olarak büyük olan NNG değerleri,

Hayvanlar arasındaki farklılık, doz-cevap ilişkisi ve sitotoksisite parametreleri gibi biyolojik anlamlılık verileri göz önünde bulundurulmalıdır. İstatistiksel yöntemler test sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı olarak kullanılabilir. Ancak, istatistiksel anlamlılık pozitif bir sonuç için tek belirleyici faktör olmamalıdır.

Her ne kadar çoğu deney açıkça pozitif veya negatif sonuçlar verse de, çok nadir durumlarda veri kümeleri test maddesinin aktivitesiyle ilgili kesin bir değerlendirme yapılmasına engel olacaktır. Sonuçlar, deneyin tekrarlanma sayısından bağımsız olarak şüpheli veya belirsiz kalabilir.

Memeli karaciğer hücrelerindeki in vivo UDS testinin pozitif sonucu, test maddesinin memeli karaciğer hücresinde programlanmamış in vitro DNA senteziyle onarılabilen in vivo DNA hasarını uyardığını gösterir. Negatif bir sonuç, test koşullarında, test maddesinin bu testle gözlenebilir bir DNA hasarını uyarmadığını gösterir.

Test maddesinin genel dolaşıma veya özel olarak hedef dokuya (ör., sistemik toksisite) ulaşma olasılığı tartışılmalıdır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Çözücü/Taşıyıcı
- taşıyıcı seçimi için gerekçe;
- eğer biliniyorsa, test maddesinin çözücü/taşıyıcı içindeki çözünürlüğü ve kararlılığı;

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;

- kaynak, barınma koşulları, beslenme vs.;
- hayvanların ayrı ayrı testin başındaki ağırlıkları, vücut ağırlığı aralığı, her bir grup için ortalama ve standart sapma dâhil.

Test koşulları:
- pozitif ve negatif taşıyıcı/çözücü kontroller;
- eğer yapıldıysa, aralık-bulma çalışmaları verileri;
- doz seviyeleri seçimi için gerekçe;
- test maddesi hazırlanmasıyla ilgili detaylar;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- uygulama yolu için gerekçe;
- test maddesinin genel dolaşıma veya hedef organa ulaştığını doğrulayan yöntemler, eğer uygulanabiliyorsa;
- eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi konsantrasyonunun (ppm) mevcut doza (mg/kg vücut ağırlığı/gün) çevrilmesi;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar;
- muamele ve örnek alma planıyla ilgili detaylı tanım;
- toksisite ölçümü yöntemleri;
- karaciğer hücresi hazırlama ve kültür yöntemi;
- kullanılan otoradyografik teknik
- hazırlanan lam sayısı ve sayılan hücre
- değerlendirme kriterleri;
- çalışmaları pozitif, negatif ve belirsiz olarak ayırma kriterleri.

Sonuçlar:
- nükleer granüller, sitoplazmik granüller ve net nükleer granüller için ayrı ayrı lam, hayvan ve grup ortalama değerleri;
- eğer mevcutsa, doz cevap ilişkisi
- eğer varsa, istatistiksel analiz;
- toksisite belirtileri;
- eş zamanlı negatif (taşıyıcı/çözücü)ve pozitif kontrol verileri;
- geçmişe yönelik (taşıyıcı/çözücü) ve pozitif kontrol verileri, aralık, ortalama ve standart sapmayla birlikte;
- eğer belirlenmişse, onarımda olan hücre sayısı;
- eğer belirlenmişse, S-fazı hücre sayısı
- hücrelerin yaşayabilirliği.

Sonuçların tartışılması.

Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

(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, 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, 123-133.

(3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and InVivo. Mutation Res., 312, 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the InVivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, 553-562.

B.40. CİLTTE AŞINMA

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

İki In vitro test, sıçan derisinde, deri içinden elektrik direnci (TER) yöntemi ve insan cildine uygulanan test modeli, ciltte aşınma için bilimsel olarak geçerli Alternatif Yöntemlerin Validasyonu için Avrupa Merkezi (ECVAM, Birleşik Araştırma Merkezi Avrupa Komisyonu) tarafından desteklenmiştir(1)(2)(3). ECVAM geçerlilik çalışması her iki testin de bilinen, cildi aşındıran ve aşındırmayan maddelerin ayrımlarının yapılmasında güvenilir olduğunu göstermiştir. Ek olarak, test protokolü, aşındırıcı etkiler arasında doğru bir ayırım sağlayan insan cilt modeline dayanır (ciddi cilt aşındırıcısı olarak bilinir, R35 ve diğer cilt aşındırıcıları, R34) (2). Her iki test için de tanımlar ve yöntemler verilmiştir, hangi testin kullanılacağının seçiminde, özel koşullar ve kullanıcının tercihleri önceliklidir.

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Tanımlar ve birimler

Cilt aşınması: test maddesinin uygulanmasını takiben ciltte geri dönüşümsüz doku hasarlarının oluşması.

1.3. Referans maddeler

Belirtilmemiştir fakat 1.5.3.4 ve 1.7.2.3. başlıklarına bakınız.

1.4. Test yönteminin ilkesi – sıçan derisinde ter (deri içinden elektrik direnci) yöntemi

Test maddesi, etiğe uygun olarak öldürülen genç sıçanların derilerinden alınan cilt disklerinin epidermal yüzeyine 24 saate kadar uygulanır. Aşındırıcı maddeler normal epidermis alt tabakası bütünlüğünün ve koruma fonksiyonunun kaybolmasını sağlamalarıyla tanımlanırlar. Bu da asıl TER'in eşik değerin altındaki azalması olarak ölçülür (5kΩ) (4)(5). Tahriş edici ve tahriş edici olmayan maddeler TER'i eşik değerinin altına düşürmezler. Yüzey aktif maddeler ve nötral organikler için boya bağlama basamağı test işlemine dâhil edilebilir (tanım için bakınız kaynak (6)) amaç özellikle bu kimyasal türlerinden elde edilen yanlış pozitif sonuçları azaltmaktır (2) (7).

1.5. Test yönteminin tanımlanması - sıçan derisinde ter yöntemi

1.5.1. Hayvanlar

Deri disklerinin hazırlanması için genç (20-23 günlük) sıçanlar (Wistar veya karşılaştırılabilir bir ırk) gereklidir. Hayvanların sırt bölgesindeki tüyler dikkatlice uzaklaştırılır. Daha sonra ilgili alan antibiyotik çözeltisine batırılır (örneğin bakteri gelişmesine engel olacak etkinlikte derişime sahip streptomisin, penisilin, kloramfenikol ve amfoterisin olabilir) hayvanlar dikkatlice silinerek yıkanır. Hayvanlar ilk yıkamadan sonra üçüncü veya dördüncü günde antibiyotiklerle tekrar yıkanır ve 3 gün içinde kullanılırlar (post hazırlanması için kullanılacak hayvanlar 31 günden daha yaşlı olmamalıdır).

1.5.2. Deri disklerinin hazırlanması

Hayvanlar insani şekilde öldürülürler. Her bir hayvanın sırt derisi alınır ve fazla yağ soyularak dikkatlice deriden uzaklaştırılır. Hayvan derisi PTFE (politetrafloroetilen) borunun sonuna yerleştirilir, epidermal yüzeyin boruyla temas etmesi sağlanır. Kauçuk bir 'O' halka deriyi tutmak için borunun sonuna yerleştirilir ve fazla doku kesilerek atılır. Boru ve 'O' halkasının boyutları Şekil 1'de gösterilmiştir. Kauçuk 'O' halkası daha sonra PTFE borunun sonuna vazelinle dikkatlice kapatılır. Boru, magnezyum sülfat çözeltisi (154mM) içeren reseptör odacığının içindeki pensle desteklenir (Şekil 2).

1.5.3. Test Yöntemi

1.5.3.1. Test maddesinin uygulanması

Sıvı test maddeleri (150µl)tüpün içindeki epidermal yüzeye uygulanır. (Şekil 2). Katı maddeler test edilirken, yeterli miktarda katı, epidermisin tüm yüzeyini kaplayacak şekilde diske uygulanır. Daha sonra katının üzerine deiyonize su (150µl) ilave edilir ve yavaş yavaş karıştırılır. Test maddeleri deriyle maksimum temas sağlamalıdır. Bazı katılar bu yüzden 30°C dereceye kadar ısıtılarak eritilir veya ezilerek toz haline getirilir.

Her madde için üç deri diski kullanılır. Test maddesi 24 saat boyunca uygulanır (ayrıca bakınız 1.5.3.4). Test maddesi 30°C dereceye kadar çeşme suyuyla hiç madde kalmayıncaya kadar yıkanarak uzaklaştırılır. Borunun içinde katışalan maddeler, 30°C dereceye kadar ılık suyla püskürterek yıkanarak uzaklaştırılır.

1.5.3.2. TER ölçümleri

TER düşük voltaj kullanılarak ölçülür, dalgalı akım veri bağlantısı (örn.. AIM 401 veya 6401, veya eşdeğeri). Elektriksel direnci ölçmeden önce, epidermisi kaplamak için, yeterli hacimde %70'lik etanol eklenerek derinin yüzey gerilimi azaltılır. Birkaç saniye sonra boru ters çevrilerek etanol uzaklaştırılır ve doku daha sonra 3 mL magnezyum sülfat çözeltisiyle (154 mM) hidratlanır. Veri bağlantı elektrotları kΩ/deri diski olarak direnci ölçmek için deri diskinin her iki tarafına da yerleştirilir (Şekil 2). Bağlantı maşalarının altında görünen elektrot boyutları ve elektrot uzunluğu Şekil 1'de gösterilmektedir. İç (kalın) elektrot, maşa direnç ölçümü sırasında PTFE borusunun üstünde durur ve elektrotun uygun bir uzunluğunun magnezyum sülfat çözeltisinin içinde olması sağlanır. Dış (ince) elektrot, reseptör odacığının içinde yer alır böylece odacığın tabanında durur. Maşanın tabanıyla PTFE borunun tabanı arasındaki uzaklık sabittir (Şekil 1) ve bu uzaklık elde edilen direnci etkiler.

Ölçülen direnç 20kΩ,'den büyükse, bu durum deri diskinin epidermal yüzeyini kaplayan test maddesine bağlı olabilir., Örneğin, PTFE boruyu eldivenli başparmakla kapatıp yaklaşık 10 saniye çalkalayarak bu kaplama uzaklaştırılmaya çalışılır; magnezyum sülfat çözeltisi atılır ve direnç ölçümü taze magnezyum sülfat çözeltisiyle tekrarlanır.

Ortalama TER sonuçları, eş zamanlı pozitif ve negatif kontrol değerlerinin yöntemde kabul edilebilir değerler olduğu koşullarda kabul edilir. Önerilen kontrol maddeleri ve onların metodoloji için tanımlanan ilgili kabul edilebilir direnç aralığı ve düzenekleri aşağıdaki şekilde tanımlanır:

Kontrol	Madde	Direnç aralığı (k)
Pozitif	10M Hidroklorik asit (%36)	0.5 - 1.0
Negatif	Saf su	10 – 25

1.5.3.3. Yüzey aktif, ve nötr organik maddeler için düzenlenmiş yöntem

Yüzey aktif veya organik olan test maddesinin TER değerleri 5kΩ'ye eşit veya bu değerden küçükse, boyanın nüfuz etmesinin değerlendirilmesi dokularda yapılabilir. Bu yöntem, sonuçların yanlış pozitif olup olmadığını belirleyecektir (2).

1.5.3.3.1. Sülforodamin B boyasının uygulanması ve uzaklaştırılması

Test maddesiyle yapılan başlangıç muamelesini takiben, 150µl, saf suyla %10 (w/v) seyreltilmiş Sülforodamin B boyası her bir deri diskinin epidermal yüzeyine 2 saat boyunca uygulanır. Deri diskleri daha sonra oda sıcaklığındaki çeşme suyuyla fazla/bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için yaklaşık 10 dakika püskürterek yıkanır Her bir deri diski PTFE borudan dikkatlice uzaklaştırılır ve deiyonize su içeren (8ml) bir küçük şişeye (ör. 20ml'lik cam sintilasyon şişesi) yerleştirilir. Şişeler fazla/ bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için 5 dakika yavaşça karıştırılır. Bu temizleme yöntemi daha sonra tekrar edilir, deri diskleri uzaklaştırılır ve 5ml, saf suda %30 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS)içeren küçük şişelere konur ve 60°C derecede bir gece inkübe edilir. İnkübasyondan sonra her bir deri diski uzaklaştırılır ve atılmış ve kalan çözelti 21°C'de 8 dakika santrifüjlenir (bağıl santrifüj kuvveti~175). Süzülen çözeltinin, 1 ml'si 1'e 5 (v/v) oranında [ör. 1ml + 4ml] saf sudaki % 30 (w/v)'luk SDS'le seyreltilir. Çözeltinin optik yoğunluğu (OD) yaklaşık olarak 565nm'de ölçülür.

1.5.3.3.2. Boya içeriğinin hesaplanması

OD değerlerinden disk başına sülforodamin B boya içeriği hesaplanır (sülforodamin B boyası molar sönüm katsayısı 565nm'de = 8.7 x 104; moleküler ağırlık= 580). Sülforodamin B boya içeriği, her bir deri diski için belirlenir ve daha sonra tekrarlar için ortalama boya içeriği hesaplanır. Ortalama boya bağlanma sonuçları, eşzamanlı kontrol değerlerinin yöntemde kabul edilebilir aralıkta olduğu koşullarda kabul edilir. Kontrol maddeleri ve metodoloji için tanımlanan, önerilen kabul edilebilir boya içeriği aralığı aşağıdaki şekilde tanımlanır:

Kontrol	Madde	Boya içerik aralığı (µg/disk)
Pozitif	10M Hidroklorik asit (%36)	40 – 100
Negatif	Distile su	15 – 35

1.5.3.4. Ek bilgi

Test maddeleri, deri disklerine daha kısa sürelerde de(ör. 2 saat) uygulanabilir böylece bu maddelerin ciddi olarak aşındırıcı olanları belirlenir. Ancak, geçerlilik çalışmasında TER yöntemi, bazı test kimyasallarının deri disklerine 2 saat boyunca uygulanmasını takiben aşındırıcı potansiyellerini tahmin etmek için bulunmuştur (2), ayrıca 24 saatlik bir uygulama sonrasında aşındırıcı olan ve olmayan maddelerin tanımlanmasını olanaklı kılmıştır.

Test düzeneğinin özellikleri boyutları ve kullanılan deney yöntemi, elde edilen TER değerlerini etkiler. 5kΩaşındırıcı eşik değeri, özel düzenek ve bu yöntemde tanımlanan işlem

kullanılarak elde edilen verilerle oluşturulmuştur. Test koşulları anlamlı olarak değişirse, farklı eşik ve kontrol değerleri uygulanabilir. Bu yüzden metodoloji ve direnç eşik değerleri geçerlilik çalışmasında kullanılan kimyasallardan seçilen bir dizi referans standardının test edilmesiyle kalibre edilir (3).

1.6. Test yönteminin ilkesi – insan cildi modeli yöntemi

Test maddesi lokal olarak 4 saat boyunca, üç boyutlu insan cilt modeline (işlevsel bir epidermis alt tabakası ile birlikte yeniden oluşturulmuş epidermis) uygulanır. Aşındırıcı maddeler hücre yaşayabilirliğini, belirlenmiş bir maruz kalma seviyesinde tanımlanan eşik değerin altına düşürme özellikleriyle tanımlıdırlar (belirlendiği gibi, örneğin, MTT indirgeme yöntemi). Yöntemin ilkesi, aşındırıcı olan kimyasalların epidermisin alt tabakasından nüfuz edebildiği (difüzyon veya erozyonla) hipotezine dayanır ve altı çizilen hücre tabakalarında hücre ölümüne neden olacak derecede sitotoksiktir(hücreler için zehirli karakter taşıyan madde).

1.7. Test yönteminin tanımlanması - insan cildi modeli yöntemi

1.7.1. İnsan cildi modelleri

İnsan cilt modelleri çeşitli kaynaklardan gelebilir fakat belli kriterler karşılanmalıdır. Modelin, canlı bir hücre temel tabakası ile işlevsel bir epidermis alt tabakası olmalıdır. Epidermis alt tabakasının bariyer fonksiyonu uygun olmalıdır. Bu durum hücrelere sitotoksik olduğu bilinen fakat normalde epidermisin alt tabakasından geçmeyen maddelerin uygulanmasını takiben, modellerin sitotoksiteye gösterdikleri dirençle açıklanabilir. Model tanımlanan deney koşullarında tekrarlanabilir sonuçlar vermelidir.

Modeldeki canlı hücrelerin yaşayabilirliği, pozitif ve negatif kontrol maddeler arasındaki ayrımı iyi yapacak yeterlilikte olmalıdır. Hücre yaşayabilirliği (örneğin MTT düşüşlerinin miktarı olarak ölçülür, ör. OD değeri) belirli model için negatif kontrol maddesine maruz kalmasını takiben kabul edilebilir sınırlarda olmalıdır. Benzer olarak, pozitif kontrol maddeleriyle birlikte hücre yaşayabilirlik değerleri (negatif kontrol için olanlara göre) belirlenen sınırlarda olmalıdır. En önemlisi kullanılan tahmin modelinin uluslararası geçerlilik standartlarını karşıladığını göstermelidir.

1.7.2. Test Yöntemi

1.7.2.1. Test maddesinin uygulanması

Sıvı maddeler için, cilt yüzeyini kaplayacak yeterlilikte (en az 25µl/cm²) test maddesi uygulanmalıdır. Katı materyaller için, cilt yüzeyini kaplayacak yeterlilikte test maddesi uygulanmalıdır ve cilde iyi temas etmesi için ıslatılmalıdır, uygun yerlerde, katı uygulanmadan önce ezilerek toz haline getirilmelidir. Uygulama yönteminin geniş bir kimyasal tipi aralığı için uygun olduğu gösterilmelidir. (ör. Bakınız kaynak 2). Maruz kalma süresinin sonunda, test maddesi cilt yüzeyinden tuzlu su çözeltisiyle yıkanarak uzaklaştırılmalıdır.

1.7.2.2. Hücre yaşayabilirlik ölçümleri

Herhangi bir nicel, geçerli yöntem hücre yaşayabilirliğini ölçmek için kullanılabilir. En sık kullanılan yöntem çeşitli laboratuarlarda doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği bilinen MTT indirgemesidir(2). Deri diski 0.3mg/ml'lik MTT çözeltisinde 20-28°C'de 3 saat boyunca tutulur. Çöken mavi formazan ürünü daha sonra ekstrakte edilir (katı ekstraksiyonu) ve formazan derişimi 545 ve 595 nm'de OD belirlenerek ölçülür.

1.7.2.3. Ek bilgi

Kullanılan cilt modeli ve maruz kalma süresinin tam protokolü ve yıkama yöntemleri vs.'nin hücre yaşayabilirlik sonuçları üzerinde önemli bir etkisi olacaktır. Yöntemin ve tahmin modelinin ECVAM geçerlilik çalışmasında kullanılan kimyasallardan seçilen bir dizi referans standardının test edilmesiyle kalibre edilmesi tavsiye edilir (3). Kullanılan yöntemin laboratuvarlar içinde ve arasında pek çok kimyasal için Ulusal standartlara uygun olarak tekrarlanabilir olduğunun gösterilmesi önemlidir. En azından yöntem daha önceden tanımlanan bilimsel geçerlilik kriterlerini karşılamalıdır (2) ve böyle bir geçerlilik çalışmasının sonuçları saygınlığı ve güvenilirliği kanıtlanmış bilimsel bir dergide yayınlanmalıdır.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

2.1.1. Sıçan derisi TER yöntemi

Test maddesi, pozitif ve negatif kontroller ve herhangi bir standart referans kimyasalı için direnç değerleri (kΩ) çizelge halinde rapor edilmelidir. Bu çizelgeye tekrarlar/tekrar edilen deneylerle ilgili veriler, ortalama değerler ve türetilen sınıflandırma da dahil edilmelidir.

2.1.2. İnsan cildi modeli yöntemi

Test maddesi için OD değerleri ve hesaplanan yüzde hücre yaşayabilirlik verileri, pozitif ve negatif kontroller ve herhangi bir standart referans kimyasalı, çizelge halinde rapor edilmelidir. Bu çizelgeye tekrarlar/tekrar edilen deneylerle ilgili veriler, ortalama değerler ve türetilen sınıflandırma da dâhil edilmelidir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

2.2.1. Sıçan derisi TER yöntemi

Test maddesi için elde edilen ortalama TER değeri 5kΩ□'dan büyükse madde aşındırıcı değildir. TER değeri 5kΩ'ya eşit veya ondan küçükse ve test maddesi yüzey aktif veya nötr organik değilse o zaman aşındırıcıdır.

TER değerleri 5kΩ'ya eşit veya bundan daha küçük olan yüzey aktif maddeler veya nötr organik çözücüler için, boyanın nüfuz etmesi uygulanabilir. Ortalama disk boya içeriği, eş zamanlı olarak elde edilen %36'lık HCl pozitif kontrolün ortalama disk boya içeriğinden

büyükse veya buna eşitse, o zaman test maddesi doğru pozitiftir ve aşındırıcıdır. Ortalama disk boya içeriği, eş zamanlı olarak elde edilen %36'lık HCl pozitif kontrolün ortalama disk boya içeriğinden küçükse, o zaman test maddesi yanlış pozitiftir ve aşındırıcı değildir.

2.2.2. İnsan cildi modeli yöntemi

Negatif kontrol OD değeri %100 hücre yaşayabilirliğini ifade eder; bu yüzden her bir test örneği için elde edilen OD değerleri negatif kontrole göre yüzde yaşayabilirlik hesaplanmasında kullanılabilir. Aşındırıcı test maddelerini, aşındırıcı olmayanlardan ayıran (veya farklı aşındırıcı sınıfları arasında ayırım yapan) kesme yüzde, hücre yaşayabilirlik değeri tahmin yönteminde, yöntem geçerli kılınmadan önce açık şekilde tanımlanmalıdır ve sonraki geçerlilik çalışması kesme değerinin uygun olduğunu göstermelidir (ör. bakınız kaynak 2).

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test maddesi aşağıdaki bilgileri içermelidir.

Test maddesi:
- kimlik bilgileri, fiziksel doğası, ilgili yerlerde fizikokimyasal özellikleri. Benzer bilgiler, eğer kullanılmışsa, referans maddeler için de sağlanmalıdır.

Test koşulları:
- kullanılan yöntemin detayları;
- herhangi bir düzenleme için tanım veya gerekçe.

Sonuçlar:
- direnç değerlerinin (TER yöntemi) çizelgesi veya test maddesi hücre yaşayabilirlik yüzdesi değerleri (insan cilt modeli yöntemi) pozitif ve negatif kontroller ve standart referans kimyasalları, tekrarlar/ tekrar deneyler için veriler ve ortalama değerler de dahildir;
- gözlenen herhangi bir etkinin tanımı.

Sonuçların tartışılması.

Sonuçlar.

4. KAYNAKLAR

(1) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & 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, 483-524.

(3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology in Vitro 12, 471-482.

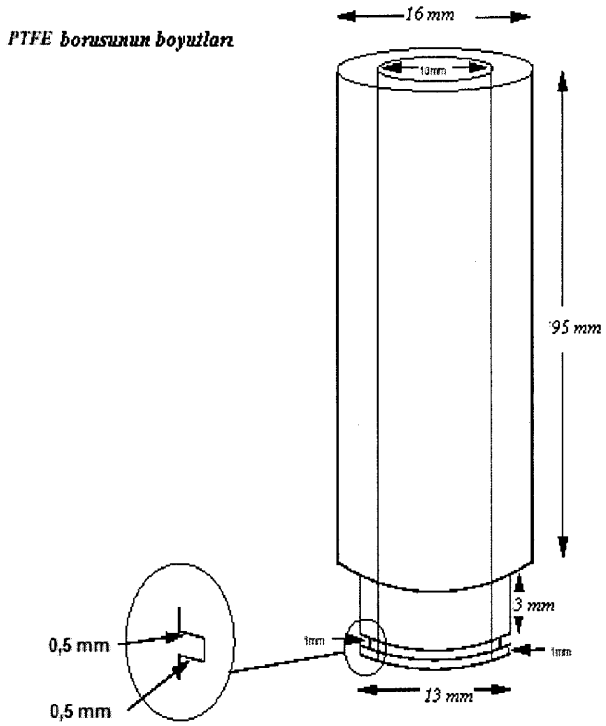
(4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986). An in vitro skin corrosivity test - modifications and validation. Food & Chemical Toxicology 24, 507-512.

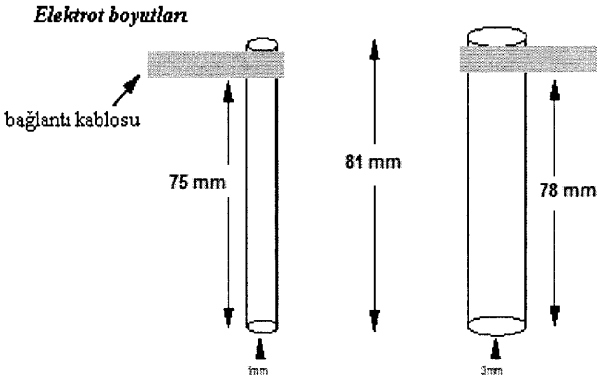
(5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial. Toxicology in Vitro 6, 191-194.

(6) 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.

(7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. ATLA 23, 219-255.

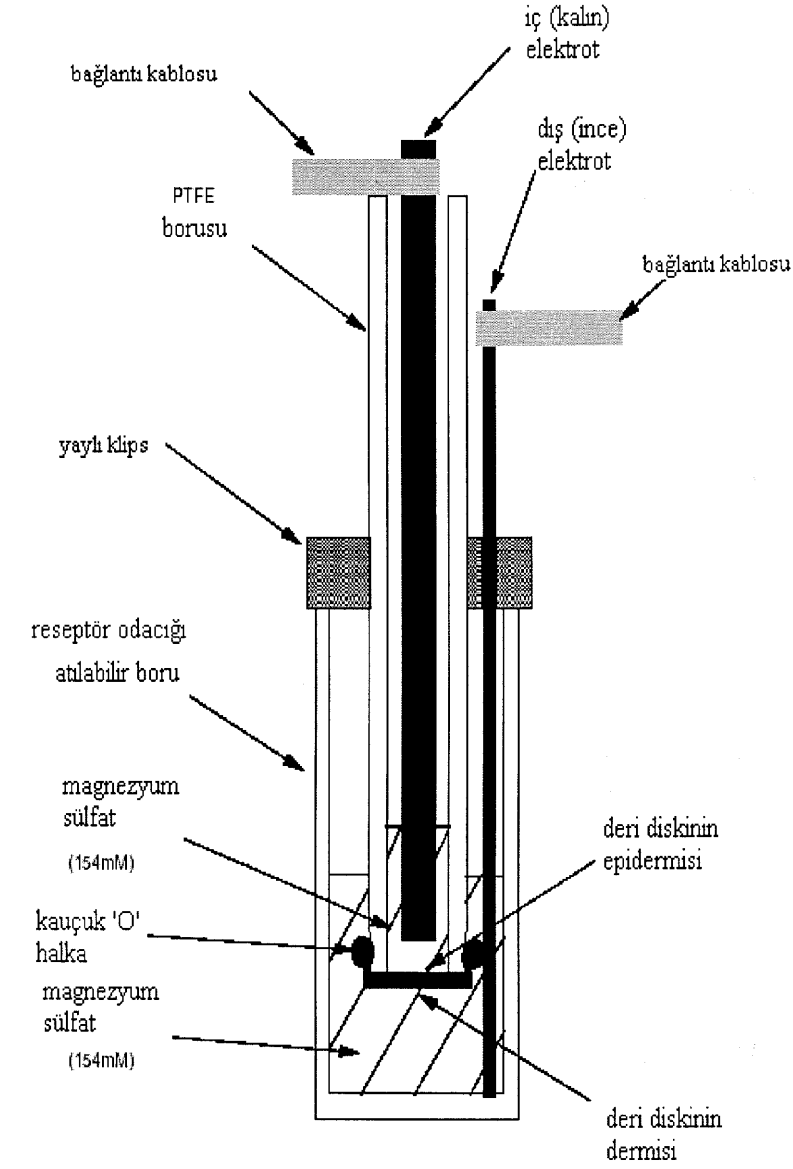
Şekil-1


PTFE borusunun boyutları
16 mm
13mm
95 mm
3 mm
1mm
1mm
13 mm
0,5 mm
0,5 mm


Elektrot boyutları
bağlantı kablosu
75 mm
1mm
81 mm
78 mm
3mm

Şekil-2

Sıçanda deri TER yöntemi için aparat



B.41. IN VITRO 3T3 NRU FOTOTOKSİSİTE TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Fototoksisite, cildin bazı kimyasallara ilk defa maruz kalması ve bunu takiben ışığa maruz kalması ile tetiklenen ve kimyasalın sistematik uygulanmasından sonra cildin ışınlamaya benzeyen indüklenmesi olarak tanımlanır.

In vitro 3T3 NRU fototoksisite testlerinden eldilen bilgiler, test maddesinin UV ve görünür ışıkla etkileşiminde ortaya çıkacak olası tehlikelerinin olması veya olmaması gibi fototoksisite potansiyelinin belirlenmesini sağlar.

In vitro teste ait toksisitede son nokta, bir kimyasal ve ışıkla beraber indüklenen fototoksisite belirlenmesi olduğundan, fototoksik bileşiklerin in vivo olarak cilde sistemik uygulanmasından ve dağılmasından ve bunun yanında cilde bölgesel olarak uygulanmasından sonra fotoiritan gibi davranan bileşikler testle belirlenebilir.

İn vitro 3T3 NRU fototoksisite testi EU/COLIPA projesinde 1992-1997 arasında geliştirilmiş ve geçerli hale getirilmiştir (1)(2)(3), böylece kullanılan çeşitli in vivo testlere alternatif olarak geçerli in vitro bir test oluşturulmuştur. 1996'da OECD çalışma toplantısında fototoksisite değerlendirmesi için in vitro kademeli test yaklaşımını tavsiye edilmiştir (4).

In vitro 3T3 NRU fototoksisite testinin sonuçları, akut fototoksisite / fotoiritan etkileriyle hayvanlarda ve insanlarda in vivo olarak karşılaştırılmış ve testin bu etkileri mükemmel şekilde öngördüğü gösterilmiştir. Her ne kadar bu özgün özelliklere sahip pek çok kimyasal in vitro 3T3 NRU fototoksisite testinde pozitif sonuç verecekse de, bu test kimyasal ve ışığın birlikte etkileşmelerinden kaynaklanan fotogenotoksisite, fotoalerji ve fotokanserojenite gibi olumsuz etkilerin tahmini için tasarlanmamıştır. İlaveten, test fototoksikpotensiyelin değerlendirmesi için tasarlanmamıştır.

Kimyasallara fototoksisite test uygulamasının sıralı bir yaklaşımı EK- I'de verilmiştir.

1.2. Tanımlar

Işık saçma (irradyans): W/m^2 or mW/cm^2 olarak ölçülen bir yüzeye çarpan ultraviyole veya görünür ışık yoğunluğu

Işık dozu: bir yüzeydeki ultraviyole (UV) veya görünür radyasyon miktarı (=şiddet ×zaman), birim yüzey alanına düşen joule (= W × s) olarak ifade edilir, ör. J/m^2 or J/cm^2.

UV ışık dalgaboyları: CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) tarafından tavsiye edilen adlandırmalar: UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) ve UVC (100-280nm). Diğer gösterimler de ayrıca kullanılır: UVB ve UVA arasındaki ayırım genellikle 320nm'de yer alır ve UVA, UV-A1 ve UV-A2 olarak ikiye ayrılabilir, ayırım 340 nm'de olur.
Hücre yaşama kabiliyeti (yaşayabilirliği): Bir hücre populasyonunun toplam aktivitesini ölçen (ör.canlıboya Neutral Red'in hücresel lizozomlara alımı), ölçülen son noktaya ve kullanılan

testin tasarımına bağlı olarak hücrelerin toplam sayıları ve/veya yaşama kabiliyetleriyle ilişkilendiren parametre

Hücre canlılığı: Tüm test prosedürü boyunca alınan (ya +UV ya da -UV) fakat test kimyasalıyla muamele edilmemiş negatif (çözücü) kontrolleriyle ilişkili olarak ifade edilen hücre yaşama kabiliyetidir.

Tahmin modeli: Bir toksisite testinin sonuçlarını potansiyel toksisite tahminine dönüştüren bir algoritmadır. Mevcut test talimatnamesinde, PIF ve MPE in vitro ^{3}T3 NRU fototoksisite testinin sonuçlarının dönüşümü ve fototoksisite potansiyelin tahminini için kullanılabilir.

PIF (Foto İritasyon Faktörü): Test kimyasalının sitotoksik olmayan UVA/vis ışığın varlığında (+UV) ve yokluğunda (-UV) elde edilen iki eşit etkili sitotoksik konsantrasyonunun (EC50) karşılaştırılmasıyla ortaya çıkan faktör.

MPE (Ortalama Foto Etki): Sitotoksik olmayan UVA/vis ışığın varlığında (+UV) ve yokluğunda (-UV) elde edilen iki konsantrasyon-cevap eğrisinin matematiksel analizinden türetilen yeni bir ölçüm.

Fototoksisite: cildin belli kimyasallara ve sonrasında ışığa maruz kalması sonucunda meydana gelen veya kimyasalın sistemik uygulamasından sonra benzer şekilde cilt irradyasyonuyla indüklenen akut toksik cevap.

Fotoiritasyon: Fototoksisite teriminin alt terimi olan, sadece kimyasallara maruz kalma sonucu (topik veya oral olarak) ciltte meydana gelen fototoksik reaksiyonları tanımlamak için kullanılan ifadedir. Bu fototoksik reaksiyonlar özel olmayan hücre hasarları oluştururlar (güneş yanığı benzeri reaksiyonlar).

Fotoalerji: kimyasalla veya ışıkla ilk muamelede ortya çıkmayan ve cilt reaksiyonunun gelişmesi için bir iki haftalık uyarılma süresine ihtiyaç duyulan kazanılmış immünolojik tepki

Fotogenotoksisite: Hücrelerin UV/görünür ışığın genotoksik olmayan dozlarına ve genotoksik olmayan kimyasala maruz kalması sonucunda ortaya çıkan, genetik bir son noktayla birlikte gözlenen genotoksik cevap,

Fotokarsinojenite: Işık veya kimyasalın tekrarlanan uygulanmalarıyla indüklenen kanserojenite. Eğer bir kimyasalla UV indüklü tümör oluşumu artıyorsa, 'foto ko-kanserojenez' terimi kullanılır.

1.3. Referans maddeler

Her bir yöntemde aynı anda test edilmesi gereken pozitif kontrol kimyasalı Klorpromazin'in yanında, yeni oluşturulan 3T3 NRU'nun fototoksisite testi için de referans kimyasal olarak kullanımı tavsiye edilmiştir (1)(3)(13).

1.4. Başlangıç düşünceleri

Fototoksik etkileri indükleyen pek çok kimyasal rapor edilmiştir (5)(6)(7)(8).Yaygın olan tek özellikleri günışığı bölgesindeki ışık enejisini soğurabilmeleridir. Fotokimyanın ilk kanununa göre (Grotthaus-Draper's Kanunu) fotoreaksiyon için ışığın yeterli düzeyde soğurulması

gerekir. Bu yüzden, göz önünde bulundurulan mevcut talimatnameye göre biyolojik testlerin uygulanmasından önce, test kimyasalının UV/vis absorpsiyon (soğurulma) spektrumunun belirlenmesi gerekir (ör. OECD Talimatnamesi 101'e göre). Eğer molar ekstinksiyon/absorpsiyon (soğurulma) katsayısı 10 litre × mol^{-1} × cm^{-1}'den küçükse, kimyasalın fotoreaktif potansiyeli yoktur ve ters fotokimyasal etkiler için in vitro 3T3 NRU fototoksisite testinin veya diğer biyolojik testlerin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaz (EK-I).

1.5. Test yönteminin ilkesi

Işığın (kimyasal) kromofor tarafından soğurularak fototoksik cevapla sonuçlandığı dört mekanizma tanımlanmıştır (7). Hepsi hücre hasarıyla sonuçlanır. Bu yüzden in vitro 3T3 NRU fototoksisite testi UVA/vis ışığın sitotoksik olmayan dozunun hem varlığında hem de yokluğunda test edilen kimyasalın sitotoksisite karşılaştırmasına dayanır. Bu testteki sitotoksisite, test kimyasalı ve ışınlama ile muameleden 24 saat sonra canlı boya, Neutral Red (NR, (9)) alımında konsantrasyona bağlı azalma olarak ifade edilir.

Balb/c 3T3 hücreleri tek katmanın oluşması için kültürde 24 saat tutulur. Test kimyasalı başına iki 96-kuyulu plaka daha sonra kimyasalın sekiz farklı konsantrasyonuyla 1 saat boyunca ön-inkübe edilir. Daha sonra, iki plakadan biri sitotoksik olmayan UVA/vis ışığa 5 J/cm^2 UVA (+UV deneyi) dozunda maruz bırakılır, diğer plaka ise karanlıkta saklanır (-UV deneyi). Her iki plakada da muamele ortamı daha sonrasında kültür ortamıyla yer değiştirir ve bir başka 24 saatlik inkübasyon sonrasında 3 saatlik Neutral Red Alımı (NRU) ile hücre yaşama kabiliyeti belirlenir. Hücre canlılığı, muamele edilmemiş negatif kontrollerin yüzdesi olarak ifade edilir, sekiz test konsantrasyonunun her biri için hesaplanır. Fototoksik potansiyelin tahmini için irradyasyon varlığında (+UV) ve yokluğunda (-UV) elde edilen konsantrasyon cevapları genellikle EC_{50} düzeyinde karşılaştırılır. (ör. hücre yaşama kabiliyetini % 50 cf. inhibe eden konsantrasyondaki muamele edilmemiş kontroller)

1.6. Kalite kriterleri

Hücrelerin UVA duyarlılığı, geçmişe yönelik veriler: Hücreler UVA duyarlılığına karşı düzenli olarak kontrol edilmelidirler. Hücreler in vitro 3T3 NRU fototoksisite testinde kullanılan yoğunlukta hazırlanır, 1-9 J/cm^2 UVA dozlarıyla bir sonraki gün ışınlanır ve NRU yöntemi kullanıldıktan bir gün sonra hücre canlılığı belirlenir. Eğer 5 J/cm2 UVA ile irradyasyon sonrasında canlılıklarıkaranlık kontrollerin canlılığından% 80'inden daha az değilse, hücreler kalite ölçütlerine uyarlar. En yüksek UVA dozu olan, 9 J/cm2, yaşayabilirlik karanlık kontrollerinkinin % 50'sinden daha az olmamalıdır. Bu kontrol hücrelerin yaklaşık her 10 uncu pasajında tekrarlanmalıdır.

Negatif kontrol hücrelerinin UVA duyarlılığı, mevcut test: Test, eğer negatif kontroller (%1'lik dimetilsülfoksit (DMSO) veya %1'lik etanol (EtOH) bulunan veya bulunmayan, Earl'ün Dengedeki Tuz Çözeltisisi (EBSS)içindeki hücreler) +UVA deneyinde eş zamanlı karanlık deneyindeki (-UVA). aynı çözücülü ışınlanmaya tabi tutulmamış hücrelerin yaşama kabiliyetlerinin % 80'inden az olmayan bir yaşama kabiliyeti gösteriyorsa kalite ölçütlerine uyar.

Negatif kontrollerin canlılıkları: Negatif kontrollerin NR ekstraktında ölçülen mutlak optik yoğunluk (OD540 NRU) kuyucuk başına ekilen 1×10^4 hücrenin yöntemin iki günü buyunca normal ikiye katlama zamanında yetişip yetişmediğine işaret eder. Eğer muamele edilememiş kontrollerin ortalama OD_{540NRU}su $\geq$0.2 ise, test kabul edilme ölçütlerini karşılar.

Pozitif kontrol: Bilinen bir fototoksik kimyasal her bir in vitro 3T3 NRU fototoksisite testiyle eş zamanlı olarak test edilir. EU/COLIPA doğrulama çalışmasında pozitif kontrol olarak Klorpromazin (CPZ) kullanılmıştır ve bu yüzden tavsiye edilir. in vitro 3T3 NRU fototoksisite testinde standart protokolle test edilen CPZ için takip eden test kabul edilebilirlik kriterleri tanımlanmıştır: CPZ ışınlanmış (+UVA): EC_{50}= 0.1 ila 2.0 µg/ml, CPZ ışınlanmamış (-UVA): EC_{50} = 7.0 ila 90.0 µg/ml. Fotoiritasyon Faktörü (PIF), ör. EC_{50} değişimi en az 6 olmalıdır.

Değerlendirilmekte olan test kimyasalının kimyasal sınıf ve çözünebilirlik karekteristiği için uygun olduğu bilinen diğer fototoksik kimyasallar da CPZ'nin yerine eşzamanlı pozitif kontrol olarak kullanılabilir. Bu durumda geçmişteki verilere dayanılarak EC50 değerlerinin aralığı ve PIF veya MPE (Ortalama Foto Etki) testin kabul edilme kriteri olarak uygun şekilde tanımlanır.

1.7. Test yönteminin tanımlanması

1.7.1. Hazırlıklar

1.7.1.1. Hücreler

Onay çalışmasında ya ATCC'den ya da ECACC'den elde edilen fare fibroblast hücre dizisi - Balb/c 3T3, klon 31 –kullanılmıştır ve bu yüzden tavsiye edilir. Diğer hücreler veya hücre dizileri, eğer kültür koşulları hücrelerin özel ihtiyaçlarına göre uyarlanmışsa aynı test protokolüyle başarılı bir şekilde kullanılabilir fakat denklik gösterilmelidir. Hücreler düzenli olarak mikoplazma kirliliği varlığına karşı kontrol edilmeli ve sadece kontrol sonuçlarının mikoplazma varlığının olmadığını gösterdiği durumlarda kullanılmalıdır.

Hücrelerin UVA duyarlılığı pasaj sayısıyla artacağından en düşük elde edilebilir pasaj sayılı Balb/c 3T3 hücreleri kullanılmalıdır. Bu da tercihen 100'den azdır. Balb/c 3T3 hücrelerinin UVA duyarlılığının bu rehberde yer alan kalite kontrol prosedürüne göre düzenli olarak kontrol edilmesi önemlidir.

1.7.1.2. Ortam ve kültür koşulları

Hücre pasajları için ve test prosedürü boyunca uygun kültür ortamı ve inkübasyon koşulları kullanılmalıdır. Balb/c 3T3 hücreleri için bunlar, %10 yeni doğmuş dana serumu destekli DMEM, 4 mM Glutamin, Penisilin ve Streptomisin ve 37°C / % 7,5 CO_2 ortamında nemlendirilmiş inkübasyon ortamıdır. Hücre kültürü koşullarını normal geçmişe yönelik aralık içinde hücre döngüsü süresine sahip hücreler veya hücre dizilerinin kullanılmasını sağlamak oldukça önemlidir.

1.7.1.3. Kültürlerin hazırlanması

Donmuş stok kültürlerden elde edilen hücreler uygun yoğunluktaki kültür ortamına ekilirler ve in vitro 3T3 NRU fototoksisite testinde kullanılmadan önce en az bir defa altkültürlenirler. (Fototoksisite testinde hücreler, öyle bir kültür ortamında ekilirler ki, kültürler test sonunda yapışamazlar, hücrenin yaşama kabiliyeti hücrelerin ekiminden 48 saat sonra belirlenir). 96-kuyulu plakada yetiştirilen Balb/c 3T3 hücreleri için, kuyu başına $1 \square 10^4$ hücre tavsiye edilen hücre yoğunluğudur. Plakalardan birinin ışınlandığı (+UVA/vis) ve diğerinin karanlıkta

tutulduğu (-UVA/vis) zaman dilimi haricinde, her bir test kimyasalı için hücreler birbirine eşit iki ayrı 96-kuyulu plakada ekilirler, daha sonra tüm test prosedürü boyunca eş zamanlı olarak eşit kültür koşulları altında tutulurlar.

1.7.1.4. Metabolik aktivasyon

Metabolize eden sistemlerin kullanılması genotoksik ve kanserojenik potansiyelin tahmini için tüm in vitro testler için genel bir gereklilik iken bugüne kadar fototoksikoloji söz konusu olduğunda, kimyasalın in vivo veya in vitro bir fototoksin gibi davranması için metabolik transformasyona ihtiyaç duyan bir kimyasal bilinmemektedir. Böylece, bu testin uygulanması için metabolik aktivasyon sistemine ihtiyaç duyulmamaktadır ve de bilimsel olarak gerekçelendirilmesi gerektiği düşünülmemektedir.

1.7.1.5. Test kimyasalı / Hazırlık

Test kimyasalları, kararlılıkla ilgili veriler saklanmanın uygun olduğunu göstermedikçe kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanmalıdır. Fotobozunma meydana gelecek gibiyse hazırlıkların kırmızı ışıkta yapılması gerekebilir.

Test kimyasalları Earl'ün Dengedeki Tuz Çözeltisisi (EBSS) veya Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) gibi tampon tuz çözeltisi içinde çözülmelidir. Işınlama sırasındaki etkileşimden kaçınmak için çözeltiler, protein içeriğinden ve ışığı soğuran pH indikatör renklerinden muaf olmalıdır.

Sudaki çözünürlüğü sınırlı olan test kimyasalları uygun çözücülerde çözülmelidir, istenilen nihai konsantrasyonun 100 katı hazırlaıp sonra da 1:100 oranında tampon tuz çözeltisiyle seyreltilirler. Eğer bir çözücü kullanılırsa tüm kültürlerde, ör. test kimyasalının negatif kontrollerle birlikte tüm konsantrasyonlarında, % 1 (v/v)'lik sabit hacimde olmalıdır.

Dimetilsülfoksit (DMSO) ve etanol (EtOH) tavsiye edilen çözücülerdir. Aseton gibi düşük sitotoksisiteli diğer çözücüler de uygun olabilir fakat böyle çözeltiler test kimyasalıyla reaksiyona girme, fototoksik etkinin bastırılması, radikal yakalama özellikleri gibi özgün özellikleri açısından dikkatlice değerlendirilmelidir. Vorteksleme ve/veya sonikasyon ve/veya 37°C 'ye ısıtma çözünürlüğe yardımcı olması açısından, eğer gerekiyorsa kullanılabilir.

1.7.1.6. UV ışınlaması / Hazırlık

Işık kaynağı: Uygun ışık kaynağı ve filtre sisteminin seçimi fototoksisite test uygulamalarında en kritik faktördür. UVA ve görünür bölge genellikle fotosentilizasyon ilgilidir (7)(10), ancak UVB bu durumla daha az ilgili olup, doğrudan oldukça sitotoksiktir, sitotoksisitesi 313-280 nm arasında 1000 kat artar (11). Uygun ışık kaynağı seçiminin ölçütleri arasında test kimyasalıyla absorblanan dalga boylarını dışarı veren ışık kaynağının olması ve ışığın dozunun (makul bir zamanda gerçekleştirilebilir) bilinen fotoduyarlılık geliştiricilerin tayin edilmesi için yeterli olması bulunmaktadır.

Ayrıca, uygulanan dalga boyları ve dozlar ısı emisyonunun dahil olduğu sisteme (infrared bölge) çok fazla zararlı olmamalıdır. Uygun ışık kaynağı olarak solar simülatörlerle güneş ışığının simülasyonu düşünülmelidir. Güneş benzetişimcilerde hem ksenon arklar ve (katkılı) civa-metal halojenür arklar kullanılır. İkincisinin daha az ısıyı dışarı vermesi ve daha ucuz olması avantajı vardır fakat güneş ışığıyla uyumu mükemmel değildir. Bütün güneş

benzetişimciler önemli miktarlarda UVB dışarı verdiğinden, oldukça sitotoksik olan UVB dalga boylarını zayıflatmak için uygun şekilde filtrelenmelidir.

In vitro 3T3 NRU fototoksisite testi için bir spektrum UVB olmadan kullanılmalıdır (UVA:UVB ~ 1:20). in vitro 3T3 NRU fototoksisite testinin doğrulama çalışmasında kullanılan filtreli güneş benzetişimci spektral ışınlama dağılımının bir örneği yayınlanmıştır (3).

Dozimetre: Işık şiddeti (irradyans) her bir toksisite testinden önce geniş bantlı bir UV ölçer kullanılarak düzenli olarak kontrol edilmelidir. UV-ölçer kaynağa göre kalibre edilmelidir. UV-ölçerin performansı kontrol edilmeli ve bu amaçla aynı tipte ikinci bir referans UV-ölçer ve aynı kalibrasyonun kullanılması tavsiye edilir. İdeal olarak filtrelenmiş ışık kaynağının spektral irradyansını ölçmek ve genişbantlı UV-ölçerin kalibrasyonunu kontrol etmek için daha geniş aralıklarda, bir spektroradyometre kullanılmalıdır fakat böyle aletlerin eğitimli kişiler tarafından uygun şekilde kullanılması gerekir.

5 J/cm² (UVA) dozun onay çalışmasında Balb/c 3T3 hücrelerine sitotoksik olmadığı ve zayıf fototoksik kimyasalları bile uyaracak yeterlilikte potansiyeli olduğu belirlenmiştir. 50 dakikada 5 J/cm²'yi elde etmek için, irradyansın 1.666 mW/cm²'ye ayarlanması gerekir. Eğer başka bir hücre dizisi veya farklı bir ışık kaynağı kullanılırsa, hücrelere zararlı olmama ve standart fototoksinleri tayin etmek için yeterli olma kriterleri kullanılarak UVA dozunun çok az ayarlanması gerekebilir. Işık maruz kalma zamanı aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{parlaklık dozu } (J/cm^2) \times 1000}{\text{parlaklık } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1\,J = 1\,W\,sec)$$

1.7.2. Test Koşulları[1]

Test kimyasalının en yüksek konsantrasyonu 100 µg/ml'yi geçmemelidir çünkü tüm fototoksik kimyasallar daha düşük konsantrasyonlarda tespit edilmişlerdir. Ancak daha yüksek konsantrasyonlarda yanlış pozitiflerin (tahminlerin üzerinde) insidansı artar (13). Test kimyasalının en yüksek konsantrasyonunun pH'sı yeterli olmalıdır (pH aralığı: 6.5-7.8).

Test edilen kimyasalın konsantrasyon aralığı ışığın varlığında (+UVA) ve yokluğunda (-UVA) önce gelen aralık bulma deneylerinde uygun şekilde tayin edilmelidir. Konsantrasyon serilerinin aralık ve kesişimleri öyle ayarlanmalıdır ki, konsantrasyon-cevap eğrileri deneysel verilerlerle desteklenmelidir. Geometrik konsantrasyon serileri (sabit bir seyreltme faktörüyle) kullanılmalıdır.

1.7.3. Test İşlemi[1]

1.7.3.1. Birinci gün

Kültür ortamında $1x10^5$ hücre/ml'lik hücre süspansiyonu hazırlanır ve 100 µL kültür ortamını yalnızca96-kuyulu doku kültürü microtiter plakanın sadece periferal duvarlarına (= körler)

[1]Kaynak (12)de daha fazla detay bulunabilir.

dağıtılır. Geriye kalan kuyulara 1 $x10^5$ hücre/ml (= 1 $x10^4$ hücre/kuyu)'lik hücre süspansiyonunun 100 µL'sini dağıtılır. Her bir test kimyasalı için, biri sitotoksisite belirlenmesi (-UVA) ve diğeri de fototoksisite belirlenmesi için (+UVA) olmak üzere iki plaka hazırlanır. Hücreleri 24 saat (% 7.5 CO_2, 37°C) yarı karışabilen tek tabaka oluşturuncaya kadar inkübe edilir. Bu inkübasyon süresi hücrenin yenilenmesini, tutunmasını ve üssel büyümesini hesaba katar.

1.7.3.2. İkinci gün

İnkübasyondan sonra kültür ortamındaki hücreler boşaltılır ve kuyu başına 150 µL EBSS/PBS ile iki defa yıkanır. Uygun miktarda test kimyasalı veya sadece çözücü (negatif kontrol) içeren 100 µL EBSS/PBS ilave edilir. 8 farklı konsantrasyondaki test kimyasalı uygulanır. Hücreleri test kimyasalıyla karanlıkta 60 dakika boyunca (%7.5 CO_2, 37°C) inkübe edilir. Yöntemin (+UVA) kısmını uygulamak için hücreler oda sıcaklığında 50 dakika boyunca 1.7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²) ile 96-kuyucuklu plaka kapağından ışınlanır. Kapağın altında H_2O'nun yoğunlaşmasını önlemek için fanla havalandırılır. İkili plakalar (-UVA) oda sıcaklığında karanlık kutuda 50 dakika (= UVA maruz kalma süresi) muhafaza edilir. Test çözeltisi dökülür ve 150 µL EBSS/PBS ile iki defa yıkanır. EBSS/PBS'i kültür ortamıyla yer değiştirilir ve bir gece (18-22 sa) inkübe edilir (7.5% CO_2, 37 °C).

1.7.3.3. Üçüncü gün

Mikroskobik değerlendirme

Hücreler faz-kontrast mikroskop altında incelenir. Hücrelerin test kimyasalının sitotoksik etkilerine bağlı morfolojik değişiklikleri kaydedilir. Deneysel hataları dahil etmemek için kontrol yapılması tavsiye edilir fakat bu kayıtlar fototoksisite veya sitotoksisite değerlendirmesinde kullanılmazlar.

Nötral Kırmızı Alım Testi

Hücreleri 150 µL önceden ılıklaştırılmış EBSS/PBS'le yıkanır. Yavaşça vurarak yıkama çözeltisi uzaklaştır. 100 µl NR ortamı eklenir ve 37 °C'de % 7.5 CO_2'li nemlendirilmiş bir ortamda 3 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra NR ortamı uzaklaştırılır, hücreler 150 µL EBSS/PBS ile yıkanır. EBSS/PBS çözeltisini tamamen boşaltılır ve kurutulur (seçmeli olarak: ters çevrilen plaka santrifüjlenir) Tam 150 µL NR desorb çözeltisi (taze hazırlanmış etanol/asetik asit) ilave edilir. Mikrodamlatıcı (microtiter) plaka, mikrodamlatıcı plaka karıştırıcısında hızlı şekilde 10 dakika boyunca NR hücrelerden ekstrakte edilinceye ve homojen bir çözelti oluşuncaya kadar karıştırılır. NR ekstraktının optik yoğunluğu bir spektrofotometrede 540 nm'de, tanık standartlar olarak kullanılarak ölçülür. Veriler daha sonraki analizler için uygun dosya formatında (ör. ASCII) saklanırlar.

2. VERİLER

2.1. Verilerin niceliği ve niteliği

Veriler UVA/vis ışınlama varlığında ve yokluğunda elde edilen konsantrasyon-cevap analizlerinin anlamlı olarak yapılabilmesini sağlamalıdır. Eğer sitotoksisite gürülürse, her iki

konsantrasyon aralığı ve konsantrasyonların ayrı ayrı kesişimleri öyle düzenlenmelidir ki deneysel verilerin oluşturduğu eğriyle çakışmalıdır. Test kimyasalının karanlık deneyinde (-UVA) belirlenen 100 µg/ml'lik sınır konsantrasyonu kadar sitotoksik olmaması fakat ışınlandığı zaman (+UVA) oldukça sitotoksik olması nedeniyle deneyin her iki kısımda da test edilecek konsantrasyon aralığının uygun veri özelliklerinin gerekliliklerini karşılaması için büyüklük dereceleri farklılık gösterir. Eğer deneyin iki kısmında da (-UVA ve +UVA), sitotoksisiteye rastlanmazsa tek dozla en yüksek konsantrasyon arasında büyük bir kesişme olan testin uygulanması yeterlidir.

Net pozitif sonuçların deneyin tekrar edilerek doğrulanmasına gerek yoktur. İlaveten, test kimyasallarının yeterince yüksek konsantrasyonlarda test edilmesi sağlanırsa net negatif sonuçların da doğrulanması gerekmez. Böyle durumlarda, bir veya daha fazla aralık-bulma ön deneyleriyle desteklenen bir ana deney yeterlidir.

Tahmin modelinin kesme çizgisine yakın, sınırda sonuçları olan testler doğrulanmaları için tekrar edilmelidir. Eğer bir tekrar testinin gerekli olduğu düşünülürse, deneysel koşulların değişkenliği net sonuçlar elde edilmesi açısından önemli olabilir. Bu testteki kilit değişken, test kimyasalı çözeltilerinin hazırlanmasıdır. Dolayısıyla, bir testin tekrarında bu koşulların değişikliği (co-çözücü, tritürasyon (öğütme), sonikasyon) en uygunu olabilir. Alternatif olarak, irradyasyon öncesindeki inkübasyon süresi değişiklikleri göz önünde bulundurulabilir. Suda kararsız olan kimyasallar için daha kısa bir süre uygun olabilir.

2.2. Sonuçların uygulanması

Mümkün yerlerde, hücresel NRU'yu (EC_{50}) % 50 inhibe eden test kimyasalı konsantrasyonu hesaplanır. Bu hesaplama konsantrasyon-cevap verilerine uygun herhangi bir doğrusal-olmayan regresyon prosedürü uygulanarak veya diğer uygun prosedürler kullanılarak yapılır (tercihen bir Hill fonksiyonu veya mantıksal regresyon kullanılır) (14). Daha sonraki hesaplamalar için EC50 kullanılmadan önce uygunluk kontrol edilmelidir. Alternatif olarak grafiksel olarak uygun olan yöntemler EC_{50} hesaplanmasında kullanılabilir. Bu durumda, olasılık kağıdının kullanılması. (x-skalası: log, y-skalası: probit) tavsiye edilir, pek çok durumda konsantrasyon-cevap fonksiyonları bu transformasyon sonrasında neredeyse doğrusal hale gelir.

2.3. Sonuçların değerlendirilmesi (tahmin modelleri)

2.3.1. Tahmin modeli, versiyon 1: Foto-Iritasyon(tahriş)-Faktorü (PIF)

Eğer ışığın hem varlığında (+UVA) hem de yokluğunda UVA) tüm konsantrasyon-cevap eğrileri elde edilirse, aşağıdaki formül kullanılarak bir Fotoiritasyon Faktörü (PIF) hesaplanır:

(a)

$$PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

PIF < 5 ise, fototoksisite potansiyel olmadığı, PIF ≥5 ise fototoksisite potansiyel olduğu tahmin edilir.

Eğer bir kimyasal sadece +UVA'da sitotoksikse ve –UVA'da test edildiğinde sitotoksik değilse her ne kadar bu sonuç fototoksisite potansiyele işaret etse de, PIF hesaplanamaz.

Böyle durumlarda eğer en yüksek konsantrasyona kadar (Cmaks), (- UV) sitotoksisite testi uygulanırsa bir "> PIF" hesaplanabilir ve bu değer "> PIF" hesaplamasında kullanılır.

(b)

$$> PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Eğer sadece bir "> PIF" elde edilebiliyorsa, o zaman >1 olan her değer fototoksisiteyi öngörür..

Kimyasalın en yüksek test konsantrasyonuna kadar hiç sitotoksisite göstermemesine bağlı olarak eğer hem EC50 (-UV) hem de EC50 (+UV) hesaplanamazsa bu durum fototoksisite potansiyelin olmadığına işaret eder. Böyle durumlarda, sonucu karakterize etmek için resmi bir "PIF = *1" kullanılır.

(c)

$$PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Eğer sadece bir "PIF = *1" elde edilebiliyorsa, fototoksisite potansiyeli olmadığı öngörülür..

(b)ve (c) durumlarında, in vitro 3T3 NRU fototoksisite testinde elde edilen derişimler fototoksisite potansiyel tahmin edilirken dikkatlice göz önünde bulundurulmalıdır.

2.3.2. Tahmin modeli, versiyon 2: Ortalama Foto Etki (MPE)

Alternatif olarak, fototoksisite potansiyelin tahmin edilmesinde yeni bir model uygulanabilir, bu model EU/COLIPA onay çalışmasının sonuçları kullanılarak geliştirilmiştir (15) ve sonraki çalışmada UV filtreleyen kimyasalların in vitro fototoksisite için kör koşullar altında test edilmiştir (13). Bu model EC50'nin elde edilemediği durumlarda PIF modelinin sınırlamalarının üstesinden gelmektedir. Model, tamamlanmış konsantrasyon-cevap eğrilerinin karşılaştırılmasına dayanan bir ölçüm olan,"Ortalama Foto Etki" (MPE)'yi kullanır. MPE modelinin uygulanması için Humboldt Üniversitesi (Berlin, A) tarafından ücretsiz olarak elde edilebilen özel bir bilgisayar yazılımı geliştirilmiştir.

2.4. Sonuçların yorumlanması

in vitro 3T3 NRU fototoksisite testindeki bir pozitif sonuç (PIF ≥5 or MPE ≥0.1) test maddesinin fototoksik potansiyeli olduğuna işaret eder. Eğer bu sonuç 10 µg/ml'nin altındaki konsantrasyonlarda elde edilmişse çeşitli in vivomaruz kalma koşullarında test kimyasalı ayrıca fototoksin gibi davranır. Eğer en yüksek test konsantrasyonunda, 100 µg/mL, pozitif bir sonuç elde edilirsezarar veya fototoksik potensiyel değerlendirmesi için daha fazla parametrenin üzerinde durmak gerekebilir. Bunlar arasında kimyasalın derideki nufüz verileri,

absorbsiyon verileri ve olası birikmesi veya kimyasalın örneğin insan in vitro cilt modeli gibi alternatif bir teyit testine tabi tutulması bulunmaktadır.

in vitro 3T3 NRU fototoksisite testindeki bir negatif sonuç (PIF < 5 veya MPE < 0.1) test maddesinin uygulandığı koşullar altında memeli hücrelerinde fototoksik olmadığına işaret eder. Kimyasalın 100 µg/ml'lik en yüksek konsantrasyona kadar test edildiği durumlarda negatif sonuç kimyasalın fototoksik potansiyeli olmadığına işaret eder ve in vivo fototoksisite olasılığı azdır. Aynı konsantrasyon-toksisite cevabının (EC50+UV ve EC50-UV) daha düşük konsantrasyonlarda elde edildiği durumlarda, verilerin yorumlanması aynı olacaktır. Tam tersine, eğer hiç toksisite yoksa (+UV and -UV) ve sulu çözeltideki çözünürlük 100 µg/ml'den daha az konsantrasyonlarla sınırlıysa, test maddesinin yöntemle uyumluluğu sorgulanmalı ve teyit testinin uygulanması düşünülmelidir (ör. invitro deri modeli veya ex vivo deri modeli veya in vivo test kullanmak).

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test kimyasalı:
- kimlik verileri ve CAS no., eğer biliniyorsa
- fiziksel doğa ve saflık
- çalışmayla bağlantılı fizikokimyasal özellikler
- kararlılık ve fotokararlılık, eğer biliniyorsa

Çözücü:
- çözücü seçimi için gerekçe
- test kimyasalının bu çözücüdeki çözünürlüğü
- uygulama ortamında bulunan çözeltinin yüzdesi (EBSS or PBS)

Hücreler:
- hücrelerin türü ve kaynağı
- mikoplazma yokluğu
- hücre pasaj sayısı, eğer biliniyorsa
- hücrelerin UVA duyarlılığı, in vitro 3T3'de kullanılan irradyasyon ekipmanıyla tayin edilir.

Test koşulları (a); muamele öncesinde ve sonrasında inkübasyon:
- kültür ortamının türü ve kompozisyonu
- inkübasyon koşulları (CO_2 konsantrasyon, sıcaklık, nem)
- inkübasyon süresi (uygulama öncesi, uygulama sonrası)

Test koşulları (b); kimyasalla muamele:
- UV/vis irradyasyonun hem varlığında hem de yokluğunda kullanılan test kimyasalı konsantrasyonlarının seçimi için gerekçe

- test kimyasalının sınırlı çözünürlüğü söz konusu olduğunda ve sitotoksisite gözlenmemişse, test edilen en yüksek konsantrasyon için gerekçe
- muamele ortamının türü ve kompozisyonu (tampon tuz çözeltisi)
- kimyasalla muamele süresi

Test koşulları (c) ;ışınlama:
- kullanılan ışık kaynağı için gerekçe
- ışık kaynağının spektral irradyans karakteristiği
- kullanılan filtrelerin transmisyon / absorpsiyon
- radyometrenin karakteristiği ve kalibrasyonuyla ilgili detaylar
- ışık kaynağının test sisteminden uzaklığı
- bu mesafedeki UVA irradyansı, mW/cm^2n olarak ifade edilir.
- UV/vis ışığa maruz kalma süresi
- UVA dozu (irradyans zaman), J/cm^2ile ifade edilir
- irradyasyon sırasında hücre kültürlerine ve eş zamanlı olarak karanlıkta tutulan hücre kültürlerine uygulanan sıcaklık

Test koşulları (d); NRU testi
- NR ortamının kompozisyonu
- NR inkübasyon süresi
- inkübasyon koşulları (CO_2 konsantrasyonu, sıcalık, nem)
- NR ekstraksiyon koşulları (ekstraktant, süre)
- optik yoğunluğunun spektrofotometrik okumaları için kullanılan dalga boyu□□
- ikinci dalga boyu (referans), eğer kullanıldıysa
- eğer kullanıldıysa, spektrofotometrik körün içeriği

Sonuçlar
- test kimyasalının her bir konsantrasyonunda elde edilen hücre yaşama kabiliyeti, kontrollerin ortalama yaşayabilirlik yüzdesi olarak ifade edilir
    - konsantrasyon cevap eğrisi (test kimyasal konsantrasyonu vs. bağıl hücre yaşama kabiliyeti), eş zamanlı olarak +UVA ve –UVA deneylerinden elde edilir
    - konsantrasyon cevap eğrisi verilerinin analizleri: eğer mümkünse EC_{50} (+UVA) ve EC_{50} (-UVA)'nın hesaplama zamanı/hesaplanması
- Foto İritasyon Faktörü (PIF) ya da Ortalama Foto Etki (MPE) hesaplanarak UVA/vis irradyasyonun varlığında ve yokluğunda elde edilen iki konsantrasyon-cevap eğrisinin karşılaştırılması,
- fototoksik potansiyelin sınıflandırılması
- testin kabul edilme kriterleri (a), eşzamanlı negatif kontrol:
- ışınlanmış ve ışınlanmamış hücrelerin bağıl yaşama kabiliyeti (NR ekstraktının optik yoğunluğu)
- negatif kontrolün geçmişe dayalı verileri, ortalama ve satandart sapma
- testin kabul edilme kriterleri (b), eşzamanlı pozitif kontrol:
- pozitif kontrol kimyasalının EC_{50} (+UVA) ve EC_{50} (-UVA) ve PIF değerleri
- pozitif kontrol kimyasalının geçmişe dayalı verileri: EC_{50}(+UVA) ve EC_{50}(-UVA) ve PIF, ortalama ve Standart sapma

Sonuçların tartışılması.
Yorumlar.

4. KAYNAKLAR

(1) 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. Toxicology in Vitro 8, 793-796.

(2) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test forphototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA 26, 7-8.

(3) 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) EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology in Vitro 12, 305-327.

(4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods – OECDPublications O ffice, Paris, 1996.

(5) Lovell W. W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology in Vitro 7, 95-102.

(6) 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 Publishin g Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.

(7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994). In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA 22, 314-348.

(8) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of photobiology"; edited by KC Smith. Plenum Press, New York; 2nd edition, pp. 79-110.

(9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Letters 24, 119-124.

(10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996). Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology"; edited by FN Marzulli and HI Maibach. Published by Taylor & Francis, Washington DC; 5th Edition, pp. 515 -530.

(11) Tyrrell R. M. and 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 Research 47, 1825-1829.

(12) ZEBET / ECVAM / COLIPA - Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test. Drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".

(13) 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 (1998). A Study on the Phot otoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU In Vitro Phot otoxicity Test. ATLA 26, 679-708.

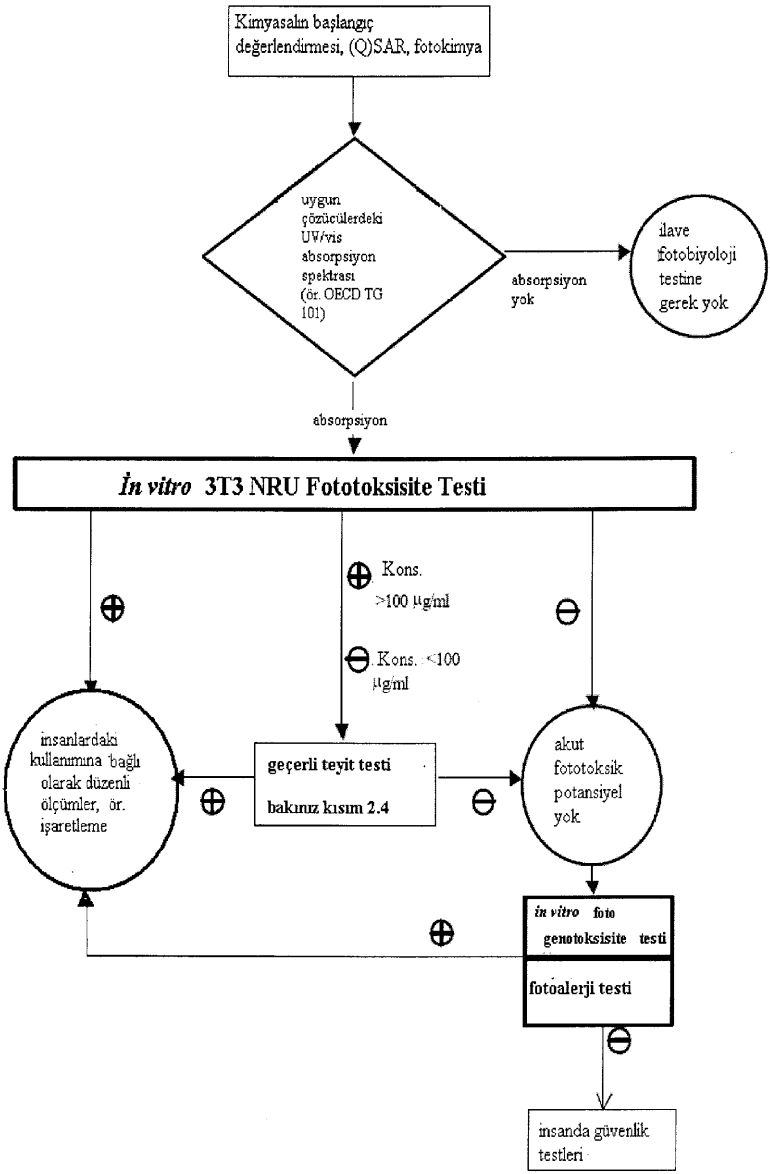
(14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. Journal of Biological Systems 3, 127-138.

(15) 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.

Ek-I

EK 1

Kimyasallara Fototoksisite Testi Uygulanmasına Sıralı Yaklaşımda 3T3 NRU'nun Rolü



B.42. CİLT DUYARLILIĞI: BÖLGESEL LENF DÜĞÜMÜ YÖNTEMİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 429 (2002)'ye eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bölgesel Lenf Düğümü Yönteminin (LLNA) geçerliliği onaylanmış ve uyarlanmış hali yeni bir yöntem olarak kabul edilmiştir (1)(2)(3). Hayvanlarda cilt hassasiyeti potansiyelinin tayini için kullanılan ikinci yöntemdir. Diğer yöntemde (B.6) kobay testleri özellikle de kobay maksimizasyon testi ve Buehler testi (4) kullanılır.

LLNA ciltte hassasiyet oluşturan kimyasalların belirlenmesi için alternatif sunar ve ciltte hassasiyete neden olma potansiyelinden yoksun kimyasalların saptanmasını sağlar. Bu durum, LLNA'nın tüm koşullarda kobay testi yerine kullanılabileceği anlamına gelmez fakat eşit değerdeki yönteme tercih edilir ancak pozitif ve negatif sonuçların genellikle daha fazla doğrulanmaya gerek olmadığını gösterdiği durumlarda alternatif olarak uygulanabilir.

LLNA gerek bilimsel ilerleme açısından gerek hayvan refahı açısından belli avantajlar sağlar. Cilt hassasiyetinin indüksiyon fazını çalışılır ve doz cevap değerlendirmesi için uygun nicel veriler sağlanır. LLNA'nın geçerliliği ile ilgili detaylar ve ilgili çalışmayla ilgili bir derleme yayınlanmıştır (5)(6)(7)(8). İlaveten, kobay test yöntemleri için uygun pozitif kontrol madde olarak tavsiye edilen ılımlı/orta şiddette hassaslaştırıcıların, LLNA'da kullanımların uygun olduğu da ayrıca not edilmelidir (6)(8)(9).

LLNA in vivo bir yöntemdir ve bu sebeple temas hassaslaştırıcı aktivitenin değerlendirilmesinde hayvan kullanımı kaçınılmazdır. Ancak, bu amaç için gereken hayvan sayısını azaltma potansiyeli vardır, ayrıca hayvanların temas hassasiyet test uygulamalarında kullanıldığı yol için önemli bir iyileştirme önerir. LLNA hassasiyetin harekete geçirilmesi fazı boyunca kimyasallarla uyarılan immünolojik olayları göz önünde bulundurulmasına dayanır. Kobay testinden farklı olarak LLNA'da deride aşırı duyarlılık reaksiyonlarının ortaya çıkması gerekmez. Ayrıca, LLNA'da kobay maksimizasyon testinde olduğu gibi adjuvan kullanılmasına gerek yoktur. Bu nedenle LLNA hayvanların acı, stres çekmesini azaltır. LLNA'nın geleneksel kobay testlerinden daha fazla avantajı olmasına rağmen, geleneksel kobay testlerinin kullanımını gerektirecek belli sınırlamaların (ör. LLNA'da belli metallerle yanlış negatif bulgular, belli cilt tahriş edicileriyle yanlış pozitif bulgular) olduğunun da bilinmesi gerekir (10).

Ayrıca bakınız Bölüm B Genel Giriş (B).

1.2. Test yönteminin ilkesi

LLNA'nın temelini oluşturan ilke şudur: duyarlılık geliştiriciler kimyasal uygulamanın lenf düğümündeki lenfositlerin primer proliferasyonlarını (çoğalmalarını) harekete geçirirler. Bu proliferasyon (çoğalma) uygulanan dozla ve allerjenin potansiyeliyle orantılıdır ve hassasiyetin basit anlamıyla tarafsız ve nicel ölçümünün elde edilmesini sağlar. LLNA bu proliferasyonu, test gruplarının proliferasyonunun taşıyıcıyla muamele edilmiş kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığı bir doz-cevap ilişkisi olarak algılar. Muamele grubundaki

proliferasyonun, kontrol grubundakine oranı, Uyarılma İndeksi olarak adlandırılır ve bir test maddesinin potansiyel cilt hassaslaştırıcısı olarak ilave değerlendirmelerinin yapılmasının öncesinde en az üç olmalıdır. Burada tanımlanan yöntemler hücre çoğalmasının ölçülmesi için radyoaktif işaretleme kullanılmasına dayanır. Proliferasyonun değerlendirilmesinde uygulanabilen diğer sonlanma noktaları için gerekçe ve uygun bilimsel destek, metodolojinin tanımı ve tüm alıntılar da dâhil, sağlanmalıdır.

1.3. Test yönteminin tanımlanması

1.3.1. Hazırlıklar

1.3.1.1. Barınma ve beslenme koşulları

Hayvanlar ayrı ayrı barındırılırlar. Deney hayvanları için oda sıcaklığı 20°C (± 3°C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranı en az %30 olmalı ve tercihen %70'i geçmemelidir, odanın temizlenmesi sırası dışında, amaç %. 50-60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır. Beslenme için, kemirici yemi ve sınırsız içme suyu sağlanabilir.

1.3.1.2. Hayvanların hazırlanması

Hayvanlar gelişigüzel seçilirler ve ayrı ayrı kimliklendirilebilmeleri için işaretlenirler. (fakat hiçbir şekilde kulaklarından işaretlenmezler) ve doz uygulamaya başlanmadan 5 gün öncesinden laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları için kafeste tutulurlar. Teste başlanmadan önce bütün hayvanlar gözlenebilen cilt lezyonlarının bulunmadığının kesinleştirilmesi için incelenirler.

1.3.2. Test Koşulları

1.3.2.1. Deney Hayvanları

Fare bu test için seçilen türdür. CBA/Ca or CBA/J ırkı, genç yetişkin nulipar fakat hamile olmayan dişi fareler kullanılır. Çalışmanın başında hayvanlar 8–12 haftalık olmalıdır ve ağırlık değişkenliği en az olup ortalama ağırlığın % 20'sini geçmemelidir. LLNA cevabında ırk ve/veya cinsiyete özgü anlamlı değişikliklerin olmadığını gösteren yeterli veri elde edildiğinde diğer suşlar ve erkekler de kullanılabilir.

1.3.2.2. Güvenilirlik kontrolü

Pozitif kontroller testin uygun performansta olduğunu göstermek ve laboratuvarın testi yürütmeye hazır olduğunu göstermek için kullanılır. Pozitif kontrol, >3 stimülasyon (uyarılam) indeksinde(SI) negatif kontrol grubunun üzerinde bir artışa neden olacağı bilinen bir maruz kalma seviyesinde, pozitif bir LLNA cevabı oluşturmalıdır. Pozitif kontrol dozu olarak indüksiyonun açık olduğu fakat aşırıya kaçmadığı doz seçilmelidir. Tercih edilen maddeler hekzil sinnamik aldehit (CAS No 101-86-0, EINECS No 202-983- 3) ve merkaptobenzotiyazoldür (CAS No 149-30-4, EINECS No 205-736-8). Uygun gerekçeleri bulunan, yukarıdaki kriterleri sağlayan diğer kontrol maddelerinin kullanıldığı durumlar da söz konusu olabilir.

Normalde bir pozitif kontrol grubu her bir yöntem için gerekebilirken test laboratuvarlarının altı ayın üzerinde ya da daha geniş bir süredeki memnun edici cevabın tutarlılığını göstermek için geçmişe yönelik uygun pozitif kontrol verilerinin olduğu durumlar bulunabilir. Bu durumlarda, pozitif kontrollerle daha az sıklıkta 6 ayı geçmeyen aralıklarla test uygulanması uygun olabilir. Ayrıca pozitif kontrol madde uygun cevabı ortaya çıkardığı bilinen taşıyıcı içinde test edilmelidir (ör., aseton: zeytin yağı). Standart olmayan bir taşıyıcı içinde (klinik/kimyasal açıdan ilgili formülasyon) test uygulamanın gerekebileceği belli düzenleyici durumlar olabilir. Böyle durumlarda, pozitif kontrolün bu geleneksel olmayan taşıyıcıyla olası etkileşimi test edilmelidir.

1.3.2.3. Hayvan sayısı, doz seviyeleri ve taşıyıcı seçimi

Doz grubu başına en az dört hayvan kullanılır, test maddesinin, test maddesinin taşıyıcısıyla muamele edilen negatif kontrol grubunun ve uygunsa, pozitif kontrolün en az üç derişimi bulunur. Hayvan verilerinin ayrı ayrı toplanmasının gerektiği bu durumlarda grup başına en az beş hayvan kullanılır. Test maddesiyle muamele edilmemeleri dışında, kontrol grubundaki hayvanlar muamele grubundaki hayvanlarla aynı şekilde elleçlenmeli ve muamele edilmelidirler.

Doz ve taşıyıcı seçimi[1] belirtilen tavsiyelere dayanır. Dozlar %100, %50, %25, %10, %5, %2.5, %1, %0.5 vs. şeklindeki konsantrasyon dizileri arasından seçilir. Üç ardışık konsantrasyonun seçiminde, mümkün yerlerde, mevcut olan ileri toksisite ve dermal tahriş verileri göz önünde bulundurulmalıdır, böylece en yüksek konsantrasyonda sistemik toksisite ve fazla bölgesel deri tahrişinden kaçınılırken maruz kalma maksimize edilir.(2)(11).

Taşıyıcı seçilirken; test maddesinin uygulanabilmesi için uygun çözelti/süspansiyon oluştururken aynı zamanda test konsantrasyonunu ve çözünürlüğünü maksimuma çıkarmasına dikkat edilir. Tercih sırasına göre tavsiye edilen taşıyıcılar aseton/zeytin yağı (4:1 v/v), dimetilformamid, metil etil keton, propilen glikol ve dimetil sülfoksittir (2)(10) fakat yeterli bilimsel gerekçe sunulduğu takdirde diğerleri de kullanılabilir. Belli durumlarda klinik olarak uygun bir çözücü veya içinde test maddesinin piyasaya sunulduğu ticari bir formülasyonun ilave bir kontrol olarak kullanılması gerekebilir. Hidrofilik materyaller deriyi ıslatan ve hemen uzaklaşmayan taşıyıcı sistemine dâhil edilmesi sağlanırken özel dikkat gösterilmelidir. Bu yüzden sulu taşıyıcılardan bütünüyle kaçınılmalıdır.

1.3.3. Test yöntemi

1.3.3.1. Deneysel takvim

Yöntemin deney takvimi aşağıdaki gibidir:

- 1.Gün:

Hayvanlar ayrı ayrı işaretlenir ve her bir hayvanın ağırlığı kaydedilir. Test maddesinin 25µl'lik uygun seyreltilmiş açık uygulaması, tek başına taşıyıcı veya pozitif kontrol (uygunsa),her bir kulağın arkasına yapılır.

- 2. ve 3. Günler:

1. gün uygulanan protokol tekrarlanır.

[1] Test maddesinin en az 3 konsantrasyonu

- 4. ve 5. Günler:

Uygulama yok.

- 6. Gün:

Her bir hayvanın ağırlığı kaydedilir. 20 µCi (7.4e + 8 Bq) 3H-metil timidin içeren 250µl fosfat tamponlu tuz çözeltisini (PBS) bütün test ve kontrol farelerine kuyruk damarından enjekte edilir. Alternatif olarak 2 µCi (7.4e + 7 Bq) ^{125}I-iododeoksiüridin ve 10^{-5} M florodeoksiüridin içeren 250 µL PBS çözeltisini tüm farelere kuyruk damarından enjekte edilir.

Beş saat sonra hayvanlar öldürülür. Her bir kulaktan çekilen kulağa ait (airukular) lenf düğümü kesilip çıkartılır ve her bir deney grubu için PBS içinde bir araya getirilir (bir araya getirilen muamele grubu yaklaşımı); alternatif olarak her bir hayvanın ayrı ayrı lenf düğümü çiftleri kesilip çıkartılır ve her bir hayvan için PBS içinde bir araya getirilebilir (bireysel hayvan yaklaşımı). Nodül tanımlanması ve diseksiyonu hakkındaki detaylar ve şekiller kaynak 10'un Ek I'inde bulunabilir.

1.3.3.2. Hücre süspansiyonlarının hazırlanması

Gerek bir araya getirilen muamele gruplarından gerek ayrı ayrı hayvanlardan iki taraflı alınan lenf düğümü hücrelerinin (LNC) tek hücre süspansiyonu 200 µm-gözenekli paslanmaz çelik ince kafes tel yardımıyla hafif mekanik ayrıştırma hazırlanır. Lenf düğümü hücreleri fazladan PBS'le iki kere yıkanır ve % 5'lik trikloroasetik asitle(TCA) 4 °C'de 18 saat çöktürülür (2). Pelletler 1 ml TCA tekrar askıya alınırlar ve 3H-sayımı için 10 ml sintilasyon sıvısı içeren sintilasyon viyallerine veya 125I-sayımı için gama sayan tüplere doğrudan aktarılırlar.

1.3.3.3. Hücre çoğalmasının belirlenmesi (birleşik radyoaktivite)

^{3}H-metil timidin katılımı dakika başına dezentegrasyon(dağılma) (DPM) olarak β-sintilasyon sayımıyla ölçülür. ^{125}I-iyododeoksiüridin katılımı ^{125}I-sayımı ile ölçülür ve ayrıca DPM olarak ifade edilir. Kullanılan yaklaşıma bağlı olarak katılım DPM/muamele grubu (bir araya getirme yaklaşımı) veya DPM/hayvan (bireysel yaklaşım) olarak ifade edilir.

1.3.3.4. Gözlemler

1.3.3.4.1. Klinik gözlemler

Hayvanlar günde bir defa herhangi bir klinik belirti -ya uygulama yerinde bölgesel tahriş ya da sistemik toksisite- için dikkatlice gözlenmelidirler. Tüm gözlemler düzenli bir şekilde her bir hayvan için ayrı ayrı olacak şekilde kaydedilmelidir.

1.3.3.4.2. Vücut ağırlıkları

Bölüm 1.3.3.1'te belirtildiği gibi ayrı ayrı her hayvanın ağırlığı testin başında ve hayvanların öldürülmesi sırasında tartılmalıdır.

1.3.4. Sonuçların hesaplanması

Sonuçlar uyarılma indeksi (SI) olarak ifade edilir. Havuzda toplama yaklaşımı kullanılırken SI her bir muamele grubu için olan bir araya getirilen radyoaktif katılımın bir araya getirilen taşıyıcı kontrol grubunun katılımına bölünmesiyle elde edilir, bu da ortalama bir SI sağlar. Bireysel yaklaşım kullanılırken SI ortalama DPM/ her bir test maddesi pozitif kontrol grubundaki hayvanın ortalama DPM/çözücü/taşıyıcı kontrol grubu için hayvana bölünmesiyle elde edilir. Bu durumda, taşıyıcıyla muamele edilmiş kontroller için ortalama SI 1'dir.

SI hesaplanmasında bireysel yaklaşımın kullanılması verilerin istatiksel analizlerinin performansını olanaklı kılar. Uygun istatiksel analiz yöntemi seçilirken, araştırmacı değişkenlerin olası eşitsizliklerinin ve veri dönüşümü veya parametrik olmayan istatiksel analiz gerektiren ilgili diğer problemlerin farkında olmalıdır. Verileri yorumlamak için uygun bir yaklaşım, muamele ve taşıyıcı kontrol grubuna ait tüm bireysel verilerin değerlendirilmesi ve bunlardan yola çıkarak, güvenilirlik sınırı da dikkate alınarak en uygun doz cevap ilişkisini elde etmektir (8)(12)(13). Ne var ki, araştırmacı cevapların alternatif ölçümlerin kullanılmasının (ör., ortalama yerine ortanca) veya aykırı cevapların ayıklanmasının gerekebileceği bir gruptaki hayvanlar için ayrı ayrı olası "aykırı„ cevaplara karşı tetikte olmalıdır.

Pozitif bir cevaba bağlı olarak karar verme süreci doz-cevap ilişkisine yönelik düşünceler, uygun yerlerde istatiksel anlamlılıkla birlikte ≥3 şeklinde bir uyarım indeksini kapsar (3)(6)(8)(12)(14).

Eğer elde edilen değerlerin netleştirilmesi gerekiyorsa, test maddesinin bilinen cilt hassaslaştırıcılarıyla yapısal ilişkisinin olup olmadığı, ciltte çok fazla tahrişe neden olup olmadığı ve görülen doza bağlı cevabın doğası gibi çeşitli özelliklerinin üzerinde durulmalıdır. Bu ve diğer düşünceler başka bir yerde detaylı olarak tartışılmıştır (7).

2. VERİLER

Veriler, ortalama ve ayrı ayrı DPM değerlerini ve taşıyıcı kontrolü de dahil her bir doz grubu için, için uyarılma indekslerini gösteren tablo halinde özetlenmelidir

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test maddesi:
- kimlik verileri (e.g., CAS numarası, varsa, kaynak; saflık; bilinen safsızlıklar; lot numarası);
- fiziksel doğası ve fizikokimyasal özellikleri (ör. uçuculuk, kararlılık, çözünürlük);
- eğer karışımsa, bileşenlerin bileşimi ve bağıl yüzdeleri

Taşıyıcı:
- kimlik verileri [saflık; konsantrasyon (nerede uygunsa); kullanılan hacim]
- taşıyıcı seçimi için gerekçe.

Test hayvanları:
- kullanılan farenin ırkı;
- hayvanların mikrobiyolojik durumu, bilindiğinde;
- hayvanların kaynağı, barınma koşulları, diyet, vs.
- hayvanların sayı, yaş ve cinsiyeti;

Test koşulları:
- test maddesinin hazırlanması ve uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- doz seçimi için gerekçe, eğer yürütülmüşse aralık bulma çalışmasından elde edilen sonuçlar dâhildir, taşıyıcı ve test maddesi konsantrasyonları ve uygulanan maddenin toplam miktarı
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar (beslenme türü/kaynağı, su kaynağı dâhildir).

Güvenilirlik kontrolü:
- madde, derişim ve kullanılan taşıyıcıya ait bilgiler dahil son güvenilirlik kontrolü sonuçlarının özeti.
- test uygulama laboratuvarı için eş zamanlı ve/veya geçmişe dayalı pozitif and negatif kontrol veriler

Sonuçlar:
- hayvanların doz uygulamasının başında ve planlanan öldürülme zamanındaki ayrı ayrı ağırlıkları.
- ortalama (biraraya getirme yaklaşımı) ve ayrı ayrı (bireysel yaklaşım) DPM değerlerini gösteren tabloyla birlikte her iki yaklaşıma ait aralık değerleriyle her bir doz (taşıyıcı kontrol de dâhildir) grubu için uyarım indeksi.
- uygun yerlerde istatiksel analizler
- her bir hayvan için toksisite belirtilerinin başlangıcı, uygulama yerindeki dermal tahriş dâhildir, eğer varsa,

Sonuçların tartışılması:
- sonuçlar, doz-cevap analizi ve istatiksel analizlerle ilgili kısa bir açıklama, uygun yerlerde test maddesinin cilt hassaslaştırıcısı olup olmadığına dair açıklama ile birlikte.

4. KAYNAKLAR

(1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lenf node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, 165-169.

(2) Kimber, I, Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lenf node assay: developments and applications. Toxicology, 93, 13-31.

(3) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the

skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lenf node assay: An interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental Health, 53, 563-79.

(4) Testing Method B.6.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lenf node assay: status of validation. Food and Chemical Toxicology, 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E (1996). The local lenf node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology, 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false pozitive responses in predictive sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology. 36, 327-33.

(8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lenf node assay: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicology, 146, 49-59.

(9) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lenf node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. Journal of Applied Toxicology, 18, 281-4.

(10) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lenf Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99- 4494, Research Triangle Park, N.C. (http://iccvam.niehs.nih.gov).

(11) Testing method B.4.

(12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended pozitive kontrol sensitisers in the maximisation, Buehler and local lenf node assays. Food and Chemical Toxicology, 31, 63-67.

(13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lenf node assay dose responses. J. Appl. Toxicology, 19, 261-266.

(14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lenf node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. Contact Dermatitis 42, 344-48.

B.43. SIÇANLARDA NÖROTOKSİSİTE ÇALIŞMASI

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 424 (1997)'ye eşdeğerdir.

Bu test yöntemi, kimyasalların yetişkin hayvanlarda potansiyel nörotoksisitesini teyit için gerekli bilgiyi elde etmek veya daha ileride bunu karakterize etmek için tasarlanmıştır. Yöntem tekrarlı doz toksisite çalışmaları için mevcut test yöntemleriyle birleştirilerek veya ayrı bir çalışma olarak yürütülür. Bu yönteme dayanan çalışmalar tasarlanırken yardımcı olması için OECD'nin Nörotoksisite Test Uygulama Yöntemleri ve Stratejileri (1) ile ilgili Rehber Dokümanına başvurulması tavsiye edilir. Bu durum, yöntemin rutin kullanımı için test protokollerinin ve gözlemlerin değişiminin tavsiye edilmesinin düşünüldüğü durumlarda bilhassa önemlidir. Rehber, özel koşullar altında kullanılabilmesi için diğer test protokollerinin seçimini kolaylaştırmak için hazırlanmıştır. Gelişimsel nörotoksisite değerlendirmeleri bu yöntemin konusu değildir.

1.1. Giriş

Kimyasalların toksik karakteristiklerinin değerlendirilmesinde nörotoksik etki potonsiyelinin göz önünde bulundurulması önemlidir. Daha önceki tekrarlı doz sistemik toksisite test yöntemleri potansiyel nörotoksisite taraması gözlemlerini içerir. Bu test yöntemi nörotoksik etkilerle ilgili daha fazla bilgi edinmek veya tekrarlı doz sistemik toksisite çalışmalarında gözlenen etkilerin teyit edilmesi amacıyla bir çalışma tasarlanmasında kullanılabilir. Ancak, belli sınıflara ait kimyasalların potansiyel nörotoksisiteleri üzerinde düşünülürken, kimyasalların önceden tekrarlı doz sistemik toksisite çalışmalarının işaret ettiği potansiyel nörotoksisitesi dikkate alınmaksızın, bu yöntem kullanılarak değerlendirilmesinin daha uygun olduğu önerilebilir. Bu gibi düşünceler örnek olarak, aşağıda belirtilenleri kapsar:

- tekrarlı doz sistematik toksisite çalışmaları dışındaki toksisite çalışmalarında, nörolojik işaretlerin veya nöropatolojik lezyonların gözlenmesi veya
- yapısal ilişki veya onları bilinen nörotoksisitelerine bağlayan diğer bilgiler

Bu yöntemin kullanılması uygun olduğunda başka örnekler de söz konusu olabilir; daha fazla detay için bakınız (1).

Bu yöntem, bir kimyasalın nörotoksik cevabının ölçümü ve karakterizasyonunun sağlanması yanında, özgün histopatolojik ve davranışsal nörotoksisitesinin doğrulanmasında gereken kriterleri karşılamak için geliştirilmiştir.

Geçmişte nörotoksisite, nöropatolojik lezyonlar ya da kriz, paraliz veya tremor gibi nörolojik fonksiyon bozuklukları kapsayan nöropatiyle eşdeğer kabul edilirdi. Her ne kadar nöropati önemli bir nörotoksisite belirtisiyse de, bugün nörotoksisitenin nöropati veya başkatipte çalışmalarda görülmeyen motor eşgüdüm kaybı, duyusal noksanlar, öğrenme ve hafıza bozuklukları gibi pek çok belirtisinin olabileceği açıktır.

Bu nörotoksisite test yöntemi, yetişkin sıçanlardaki majör nörodavranışsal and nöropatolojik etkileri tespit etmek için tasarlanmıştır. Davranışsal etkiler, morfolojik değişiklikler olmasa bile, organizma üzerinde olumsuz etki yaratabilir fakat tüm davranış değişiklikleri sinir sistemine özgü değildir. Bu yüzden gözlenen herhangi bir değişiklik diğer tipteki sistemik

toksisite yanında karşılıklı histopatolojik, hematolojik veya biyolojik verilerle birlikte değerlendirilmelidir. Bu yöntemde, nörotoksik cevabın ölçümünü ve karakterizasyonunu sağlaması istenen test uygulaması, sonrasında elektrofizyolojik ve/veya biyokimyasal araştırmalarla desteklenebilen özgün histopatolojik ve davranışsal prosedürleri kapsar (1)(2)(3)(4).

Nörotoksikanlar sinir siteminde pek çok hedef üzerine çeşitli mekanizmalarla etki edebilirler. Testler, tüm maddelerin nörotoksik potansiyelini kapsamlı değerlendirebilecek tek bir dizi (single array) olmadığından gözlenen veya beklenen nörotoksisite türüne özgü diğer in vivo veya in vitro testlerin kullanılması gerekebilir.

Bu test yöntemi ayrıca kimyasalın bilinen veya şüpheli zararlarını kanıtlamak, daha iyi bir 'olumsuz etki gözlemlenmeyen seviye' tahmininde bulunmak için; doz-cevap ölçümlerinin hassasiyetinin düzenli olarak artırılması veya karakterize edilmesi amaçlı OECD'nin Nörotoksisite Test Uygulama Yöntemleri ve Stratejileri (1) ile ilgili Rehber Dokümanında beyan edilen rehberle beraber kullanılabilir. Örneğin, çalışmalar nörotoksik mekanizmayı(ları) bulmak ve değerlendirmek veya temel nörodavranışsal ve nöropatolojik gözlem prosedürleri kullanılarak önceden elde edilen verileri tamamlamak amacıyla tasarlanabilir.

Böyle çalışmalarda, bu yöntemde tavsiye edilen standart prosedürler kullanılarak oluşturulan verilerin – eğer bu veriler önceden mevcutsa- tekrarlanmalarına ve sonuçların yorumlanmasında göz önünde bulundurulmalarına ihtiyaç yoktur.

Bu nörotoksisite çalışması, tek başına ya da birlikte kullanıldığında aşağıdaki özelliklere sahip bilgileri sağlar:

- sinir sisteminin test edilen kimyasalla kalıcı mı yoksa tersinmez olarak mı etkilendiğini tanımlar;
- kimyasala maruz kalmaile ilişkili olan sinir sistemi değişikliklerinin karakterizasyonuna ve temel oluşturan mekanizmanın anlaşılmasına katkıda bulunur.
- hiçbir olumsuz etkinin görülmediği dozun (kimyasalın güvenlik kriterini oluşturmak için kullanılır) tahmini için doz-cevap ve zaman-cevap ilişkisini belirler

Bu test yönteminde test maddesi ağız yoluyla uygulanır. Dermal veya solunum gibi diğer uygulama yolları da uygun olabilir fakat tavsiye edilen prosedürlerin yeniden düzenlenmesi gerekebilir. Uygulama yolunun seçimiyle ilgili düşünceler insan maruz kalma profiline ve mevcut toksikolojik ve kinetik bilgilere bağlıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Olumsuz etki: Muameleye bağlı olarak,organizmanın hayatta kalma, üreme ve çevreye uyum sağlama kabiliyetini azaltannormalden herhangi bir sapma.

Doz: Uygulanan test maddesinin miktarı. Doz, ağırlık (g, mg) veya test hayvanının birim ağırlığı başına düşen test maddesinin ağırlığı (e.g. mg/Kg) veya sabit diyet konsantrasyonları (ppm) olarak ifade edilir.

Dozaj: Doz, doz frekansı ve doz uygulanması süresini içine alan genel ifade.

Nörotoksisite: Bir kimyasal, biyolojik veya fiziksel ajana maruz kalma sonucunda sinir sisteminin yapısında veya fonksiyonunda meydana gelen ters değişiklik

Nörotoksikan: Nörotoksisiteye neden olma potansiyeli olan herhangi bir kimyasal, biyolojik veya fiziksel ajan.

NOAEL: Hiçbir ters etkinin gözlemlenmediği seviye

1.3. Test yönteminin ilkesi

Test edilecek kimyasal oral yolla, bir doz aralığında çeşitli gruplardaki laboratuvar kemirgenlerine uygulanır. Normalde tekrarlı dozlara ihtiyaç duyulur ve doz uygulama kürü 28 gün, subkronik (90 gün) veya kronik (1 yıl veya daha fazla) olabilir. Bu yöntemde beyan edilen prosedürler akut nörotoksisite çalışmalarında da kullanılabilir. Hayvanlar davranışsal ve/veya nörolojik anomalilerin belirlenmesi veya karakterizasyonu için test edilirler. Nörotoksikanlardan etkilenen davranış aralığı her bir gözlem süresi sonunda değerlendirilir. Testin sonunda her gruptan her bir cinsiyetten hayvanların alt kümesi in situ perfüze edilir ve beynin kısımları, spinal cord ve periferal sinirler hazırlanıp incelenir.

Çalışma, tek başına nörotoksisite taranması veya nörotoksik etkilerin karakterize edilmesi çalışması olarak yürütüldüğünde her bir gruptaki tüm hayvanlar perfüzyon ve sonrasında histopatoloji (bakınız Tablo 1) için kullanılmazlar, bu yöntemin gerektirdiği standart incelemelerden elde edilen verileri tamamlayabilecek özgün nörodavranışsal, nöropatolojik, nörokimyasal veya elektrofizyolojik prosedürler için kullanılabilirler (1). Bu tamamlayıcı protokoller bilhassa deneysel gözlemler veya beklenen etkiler kimyasalın özgün tipte ya da hedef nörotoksisitesine işaret ettiği zaman faydalı olabilir. Alternatif olarak, geriye kalan hayvanlar kemirgenlerdeki tekrarlı doz toksisitesi çalışmaları test yöntemlerinde istenilen değerlendirmeler için kullanılabilir.

Bu test yönteminin protokolleri diğer test yöntemlerinin protokolleriyle birleştirildiğinde her iki çalışmanın gözlemleri için gerekli olanları sağlamak adına yeterli sayıda hayvana ihtiyaç vardır.

1.4. Test yönteminin tanımlanması

1.4.1. Hayvan türlerinin seçimi

Tercih edilen tür sıçandır, diğer rodent türleri de gerekçeleri belirtilerek kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan laboratuvar suşlarının genç yetişkin ve sağlıklı olanları kullanılmalıdır. Dişilerin hiç dogum yapmamış olmaları ve hamile olmamaları gerekir. Doz uygulaması normalde sütten kesilmeden sonra mümkün olduğunca kısa sürede başlamalı tercihen hayvanlar altı haftalığı geçmemiş ve her koşulda dokuz haftalıktan küçük olmalıdırlar. Ne var ki bu çalışma diğer çalışmalarla birleştirildiğinde yaşla ilgili gerekliliğinin düzenlenmesine ihtiyaç duyulabilir.

Çalışmanın başlangıcında kullanılan hayvanların ağırlık değişkenlikleri her iki cinsiyet için ortalama ağırlığın ± 20 %'sini geçmemelidir. Kısa süreli bir tekrarlı doz çalışması uzun süreli bir çalışmanın ön çalışması olarak yürütülürse her iki çalışmada kullanılan hayvanlar aynı ırk ve kaynaktan olmalıdır.

1.4.2. Barınma ve beslenme koşulları

Deney hayvanları için oda sıcaklığı 20°C (± 3°C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranı en az %30 olmalı ve tercihen %70'i geçmemelidir, odanın temizlenmesi sırası dışında, amaç %50-60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır.

Gürültülü belli aralıklarla gelen ses en azda tutulmalıdır. Beslenme için, geleneksel laboratuvar yiyecekleri ve sınırsız içme suyu sağlanabilir. Beslenme şeklinin seçimi bu yöntemle uygulandığında test maddesinin uygun bir karışımının temin edilmesi ihtiyacından etkilenebilir. Hayvanlar ayrı ayrı veya aynı cinsiyetten küçük gruplar halinde kafeslere yerleştirilebilirler.

1.4.3. Hayvanların hazırlanması

Sağlıklı genç hayvanlar rastgele muamele ve kontrol grupları olarak ayrılırlar. Kafesler, yerleştirilmelerinden kaynaklanan olası etkileri en aza indirecek şekilde yerleştirilmelidir. Hayvanlar, tek olarak kimliklendirilirler ve laboratuar koşullarına alışmaları için çalışmanın başlamasından en az (5) beş gün öncesinden kafeslerinde tutulurlar.

1.4.4. Uygulama yolu ve dozların hazırlanması

Bu test yöntemi özel olarak test maddesinin oral yolla uygulanmasına işaret eder. Oral uygulama gavaj, besin, içme suyu veya kapsülle yapılabilir. Dermal veya solunum gibi diğer uygulama yolları da kullanılır ancak protokollerin yeniden düzenlenmesi tavsiye edilir. Uygulama yolunun seçimi, insan maruz kalma yolu ve mevcut olan toksikolojik ve kinetik bilgilere dayanır. Uygulama yolunun seçilme gerekçesi yanında bu yöntemin prosedürlerindeki düzenlemelerin sonuçları da gösterilmelidir.

Gerektiğinde test maddesi uygun bir taşıyıcı içinde çözünebilir veya askıda kalabilir. Sulu çözeltinin/süspansiyonun kullanımı tavsiye edilir bunu tercih edilme sırasına göre yağda (ör.mısır yağı) çözeltinin/süspansiyonun kullanımı ve diğer taşıyıcılardaki mümkün çözelti/süspansiyon kullanımı izler. Taşıyıcının toksik karakteristiği bilinmelidir. İlaveten taşıyıcının test maddesinin soğurum, dağılım, metabolizma veya alıkonması ile ilgili, maddenin toksik karakteristiğini değiştirebilecek olan etkileri ve gıda ve su tüketimiyle ilgili veya hayvanın beslenme durumu üzerindeki etkiler gibi adı geçen karakteristiklerine önem verilmelidir.

1.5. İşlemler

1.5.1. Hayvanların sayı ve cinsiyeti

Çalışma ayrı olarak yürütüldüğünde detaylı klinik ve fonksiyonel gözlemlerin yapılması için her bir doz ve kontrol grubu için en az 20 hayvan (10 dişi ve 10 erkek) kullanılmalıdır. Bu 10 erkek ve 10 dişi arasından seçilen en az beş erkek ve beş dişi, in situ perfüze edilmelidir ve çalışmanın sonunda detaylı nörohistopatoloji için kullanılır. Belli bir doz grubunda sadece sınırlı sayıda hayvanın nörotoksik etkiler için gözlemlendiği durumlarda, perfüzyon için seçilen hayvanların dahil edilmelerine önem verilmelidir. Çalışmanın tekrarlı doz toksisite çalışmasıyla birlikte yürütüldüğü durumlarda, her iki çalışmanın hedeflerini de karşılamak için uygun sayıda hayvan kullanılmalıdır. Çalışmaların çeşitli kombinasyonları için grup

başına en az hayvan sayısı Tablo 1'de verilmiştir. Eğer arada hayvan öldürülmesi veya iyileşme gruplarının uygulama sonrasındaki tersinirlik, kalıcılık veya gecikmiş toksik etkiler için gözlenmesi planlanıyorsa veya tamamlayıcı gözlemler düşünülüyorsa o zaman gözlemler ve histopatoloji için gereken hayvan sayısının sağlanabilmesi için sayıları artırılmalıdır.

1.5.2. Uygulama ve kontrol grubu

Genel olarak en az üç doz grubu ve bir kontrol grubu kullanılmalıdır, Diğer verilerin değerlendirilmesi sonucunda, 1000 mg/kg va/g dozda tekrarlı dozdan hiçbir etki beklenmiyorsa sınır testi yapılabilir. Eğer uygun veri yoksa kullanılacak dozların belirlenmesine yönelik olarak aralık belirlemek için bir çalışma yapılabilir. Test maddesi uygulanacak olanlar haricinde kontrol grubunda yer alan hayvanlara, test grubu denekleriyle eşit bir şekilde muamele edilmelidir. Test maddesi uygulanırken taşıyıcı kullanılmışsa, kontrol grubu kullanılan en yüksek hacimle taşıyıcıyı almalıdır.

1.5.3. Güvenilirlik kontrolu

Laboratuvar uygulama çalışmaları, kullanılan prosedürlerin çalışmayı yürütecek yetkinlikte olduğunu ve hassasiyetini göstermelidir. Böyle veriler otonomik belirtiler, duyusal tepkinlik, ekleme bağlı uzuvların kavrama gücü ve motor aktivite gibi gözlenmesi tavsiye edilen farklı sonnoktalardaki değişiklikleri tespit etmek ve uygun olduğunda nicelemek için muktedir olduğuna dair kanıt sağlamalıdırFarklı tipte nörotoksik cevaplara neden olan kimyasallarla ilgili bilgiler ve pozitif kontrol madde olarak kullanılabilenler kaynak 2-9'arasındadır. Eğer deneysel prosedürün önemli kısımları aynı kalırsa, geçmişe yönelik veriler kullanılabilir. Geçmişe yönelik verilerin periyodik olarak güncellenmesi tavsiye edilir. Test prosedürlerinin yürütülmesindeki bazı esas bileşenlerin uygulama laboratuarı tarafından değiştirildiği durumlarda, prosedürlerin hassasiyetlerinin devamlılığını gösteren yeni veriler oluşturulmalıdır.

1.5.4. Doz seçimi

Dozlar, test maddesi veya ilgili materyaller için mevcut herhangi bir toksisite ve ulaşılabilir (toksiko) kinetik veriler dikkate alınarak seçilmelidir. En yüksek doz ciddi zararlara ve ölüme neden olmadan nörotoksik etkilerin veya net sistemik toksik etkilerin indüklenmesi amacıyla seçilmelidir. Daha sonra, dozların, doza bağlı herhangi bir cevabı ve en düşük dozda herhangi bir olumsuz etkinin gözlemlenmediğini (NOAEL) gösterecek şekilde, azalan sıralaması seçilmelidir. Prensipte, dozlar öyle ayarlanmalıdır ki, sinir sistemindeki primer toksik etkiler sistemik toksisiteyle ilgili etkilerden ayırt edilebilsin. Azalan dozları ayarlamak için 2-3 kat arasındaki aralıklar genelde en uygunudur ve dördüncü bir test grubunun eklenmesi dozlar arasında geniş aralıklar (ör. 10 faktörden daha fazla) kullanılmasına çoğunlukla tercih edilir. İnsan maruz kalımıyla ilgili anlamlı bir tahmin varsa, dikkate alınmalıdır.

1.5.5. Sınır testi

Eğer bu çalışma için tanımlanan protokoller kullanılarak uygulanan 1000 mg/kg vücut ağırlığı/gün doz bir sınır testi gözlenebilen herhangi bir toksik etki meydana getirmiyorsa ve eğer yapısal olarak benzer maddelerle ilgili verilere dayanılarak toksisite beklenmiyorsa bu durumda üç doz kullanılarak yapılacak kapsamlı bir çalışmaya gerek olmayabilir. Beklenen insan maruz kalması daha yüksek bir oral doz kullanılması gerektiğine işaret edebilir.

İnhalasyon, dermal uygulama gibi diğer uygulama yolları için, test maddesinin fizikokimyasal özellikleri sıkça maksimuma ulaşılabilir maruz kalma seviyesini kabul ettirebilir. Oral akut çalışmayı yürütmek için, sınır testi için en az doz 2000 mg/kg.

1.5.6. Dozların uygulanması

Hayvanlar test maddesiyle günlük olarak haftada yedi gün en az 28 gün boyunca muamele edilirler; 5-günlük doz uygulama kürü veya daha kısa süreli maruz kalma sürelerinin gerekçelendirilmesi gerekir. Test maddesi gavajla uygulandığında bu uygulama tek doz olarak gavaj yöntemi veya entübasyon kanülü kullanılarak yapılmalıdır. Sıvının tek seferde uygulanabilecek maksimum hacmi test hayvanlarının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim normalde 1ml/100g vücut ağırlığını geçmemelidir ancak sulu çözeltilerde 2ml/100g vücut ağırlığı düşünülebilir. Normalde daha yüksek konsantrasyonlarda daha kötü etkiler meydana getiren tahriş edici ve aşındırıcı maddeler haricindeki maddeler için konsantrasyonu tüm doz seviyelerinde sabit olacak şekilde ayarlanmasıyla test hacmindeki değişkenler en aza indirilir.

İçme suyu veya diyet yoluyla uygulanan maddeler için, test maddesinin normal beslenme veya su dengesiyle etkileşmemesinin sağlanması gerekir. Test maddesi diyetin içinde sabit diyet derişimi (ppm) veya sabit doz uygulandığında hayvanın vücut ağırlığının esas alındığı durum kullanılır, alternatif bir durum gerekçelendirilmelidir. Doz, gavaj yoluyla uygulanan maddeler için günün benzer zamanlarında verilmelidir ve gerekiyorsa hayvanın vücut ağırlığı açısından sabit bir doz elde etmek için ayarlanmalıdır. Uzun süreli bir çalışmanın ön çalışması olarak tekrarlı doz çalışması yapıldığında her iki çalışmada da benzer diyetler kullanılmalıdır. Akut çalışmalar için eğer tek doz mümkün değilse, doz 24 saati geçmeyen periyotlarda daha küçük parçalar halinde verilebilir.

1.6. Gözlem

1.6.1. Testlerin ve gözlemlerin sıklığı

Tekrarlı doz çalışmalarında gözlem süresi dozaj süresini kapsamalıdır.. Akut çalışmalarda, uygulama sonrasında 14 gün gözlem yapılmalıdır. Uydu grubunda bulunan, muamele sonrasındaki sürede de maruz bırakılmamış hayvanlar için gözlemler bu süreyi de içine almalıdır.

Gözlemler, yeterli aralıklarla ve herhangi bir davranışsal ve/veya nörolojik anomalilerin belirlenme olasığını artıracak şekilde yapılmalıdır. Gözlemler tercihen aynı günün aynı zamanlarında ve doz uygulamasından sonraki beklenen etkilerin en yüksek olduğu zamanlar göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Klinik gözlemlerin ve fonksiyonel testlerin sıklığı Tablo 2'de özetlenmiştir. Eğer daha önceki çalışmalardan elde edilen kinetik veya diğer veriler gözlemler, testler veya gözlem sonrası süreç için farklı zaman noktaları kullanılması gerektiğine işaret ediyorsa, en fazla bilgi elde edebilmek için alternatif bir program hazırlanmalıdır. Programdaki değişiklikler için gerekçe sağlanmalıdır.

1.6.1.1. Genel sağlık koşullarının ve ölüm/hastalık oranının gözlenmesi

Bütün hayvanlar günde en az bir defa sağlık koşullarıyla ilgili olarak, bunun yanında günde en az iki defa da hastalık ve ölüm oranları için dikkatlice gözlenmelidirler.

1.6.1.2. Detaylı klinik gözlemler

Detaylı klinik gözlemler bu amaçla seçilmiş tüm hayvanlar üzerinde (bakınız Tablo 1) ilk maruz kalmadan önce bir defa (karşılaştırmaya olanak sağlamak için) ve daha sonra da çalışmanın uzunluğuna bağlı olarak farklı aralıklarla (bakınız Tablo 2) yapılmalıdır. Uydu iyileşme gruplarındaki detaylı klinik gözlemler iyileşme sürecinin sonunda yapılmalıdır. Detaylı klinik gözlemler barındıkları kafesin dışındaki standart bir alanda yapılmalıdır. Gözlemler, gözlemdeki her ölçüm için gerekli ölçütleri veya skorlama ölçeklerini içeren skorlama sistemleri kullanılarak dikkatlice kaydedilmelidir. Kullanılan kriterler veya skalalar test uygulama laboratuarı tarafından açıkça tanımlanmalıdır. Test koşullarındaki değişkenlerin çok az olması (sistematik olarak muameleye bağlı değildir) ve gözlemlerin o andaki muamele hakkında bilgisi bulunmayan eğitimli gözlemciler tarafından yürütüldüğünü kesinleştirmek için çaba sarfedilmelidir.

Gözlemlerin iyi tanımlanmış kriterlerin ('normal' aralık tanımı dahildir) her bir gözlem zamanında her bir hayvana sistematik şekilde uygulandığı yapılandırılmış bir modelde yürütülmesi tavsiye edilir. "Normal aralık" uygun şekilde belgelenmelidir. Gözlenen tüm belirtiler kaydedilmelidir. Yapılabiliyorsa, gözlenen belirtilerin şiddetleri de ayrıca kaydedilmelidir. Klinik gözlemlere ciltteki, kürkteki, gözlerdeki, mukoz membranlardaki değişiklikleri, salgılama başlaması, atılım ve otonomik aktivite (lakrimasyon, piloereksiyon, gözbebeği büyüklüğü, solunumla ilgili olağan dışı durumlar, idrar ve dışkı yapmayla ilgili beklenmedik belirtileri ve rengi bozulmuş idrar) dahil olmalı ancak gözlemler bunlarla sınırlı olmamalıdır.

Vücudun pozisyonuna bağlı olarak alışılmamış herhangi bir cevap, aktivite seviyesi (azalmış veya artmış standart alan tetkikleri) ve hareket koordinasyonu ayrıca not edilmelidir. Yürümedeki değişiklikler (ör., paytak yürüyüş, ataksi), duruş (ör., kamburluk) ve kavramak, yerleştirmek veya diğer çevresel uyarılara reaktivite klonik veya tonik hareketlerin varlığı, konvülziyonlar, veya tremorlar, stereotipler (ör., kendi kendini temizleme, aşılmadık kafa hareketleri, tekrarlanan daire çizme) veya tuhaf davranış (ör., ısırmak veya aşırı yalama, kendini sakatlama, geriye doğru yürüme, seslendirme) veya saldırganlık kaydedilmelidir.

1.6.1.3. Fonksiyonel testler

Detaylı klinik gözlemlere benzer olarak, fonksiyonel testler de maruz kalmadan önce sıkça bu amaç için seçilen tüm hayvanlarda yürütülmelidir (bakınız Tablo 1). Fonksiyonel testlerin frekansı da ayrıca çalışmanın süresine bağlıdır (bakınız Tablo 2). Tablo 2'de beyan edilen gözlem sürelerine ilaveten uydu iyileşme gruplarındaki fonksiyonel gözlemler de en son öldürülmelere mümkün olduğunca yakın zamanda yapılmalıdır. Fonksiyonel testler farklı duyuların uyarılmasına duyumsal tepkiyi [ör., işitsel, görsel ve proprioseptif uyarı(5)(6)(7)], ekleme bağlı uzvların kavrama gücü değerlendirilmesi (8) ve motor aktivite değerlendirilmesini(9) içine alır. Motor aktivite ölçümleri aktivitedeki düşüşleri ve artışları ölçecek otomatik bir cihazla yapılmalıdır. Eğer tanımlanan başka bir sistem kullanılırsa, bu sistem nicel olmalı ve hassasiyeti ve güvenilirliği gösterilmelidir. Her bir cihaz zaman karşısındaki güvenilirliğinin ve cihazlar arasındaki tutarlılığının tespit edilmesi için test edilmelidir. Takip edilen prosedürlerle ilgili daha fazla ayrıntı ilgili kaynaklarda verilmiştir. Potansiyel nörotoksik etkilere işaret eden hiçbir veri yoksa (ör. Yapı-aktivite, epidemiyolojik veriler, diğer toksisite çalışmaları) duyu ve motor fonksiyonlar veya öğrenme ve hafıza ile ilgili daha özelleştirilmiş testlerle olası etkilerin detaylı olarak incelenebilmesi için bu

testlerin içeriklerinin üzerinde durulmalıdır. Daha özelleştirilmiş testler ve kullanımları hakkında bilgiler (1)'de sağlanmıştır.

İstisnai olarak, fonksiyonel testle etkileşecek kapsamda toksisite belirtileri gösteren hayvanlar o testtin dışında bırakılırlabilirler. Böyle durumlarda hayvanların test dışında bırakılmalarının gerekçesi belirtilmelidir.

1.6.2. Vücut ağırlığı ve gıda/su tüketimi

90 güne kadar süren çalışmalar için, tüm hayvanlar haftada en az bir defa tartılmalı ve gıda tüketimi ölçümleriyle test maddesi su gerektiren bir ortamda uygulanmışsa su tüketimi ölçümleri, en az haftalık olarak yapılmalıdır. Uzun süreli çalışmalar için, tüm hayvanlar ilk 13 hafta için en az haftada bir defa ve daha sonra da her dört haftada bir en az bir defa tartılmalıdırlar. Gıda tüketimi ölçümleri ve test maddesi su gerektiren bir ortamda uygulanmışsa su tüketimi ölçümleri, hayvanların sağlık durumu veya vücut ağırlığı değişiklikleri başka türlüsünün uygulanması gerektiğine işaret etmediği sürece çalışmanın 13 haftası boyunca haftalık olarak, sonrasında da yaklaşık üç aylık aralıklarla yapılmalıdır. Vücut ağırlıkları tüm hayvanlar için ayrı ayrı test süresinin ilk 13 haftasında haftada bir defa ve daha sonra da her dört haftada bir en az bir defa kaydedilmelidir.

1.6.3. Oftalmoloji

28 günden daha uzun süren çalışmalar için, oftalmolojik inceleme, oftalmoskop veya eşdeğeri uygun bir alet kullanmı test maddesi uygulanmadan önce ve çalışmanın sonunda, tercihen tüm hayvanlarda fakat en az en yüksek doz ve kontrol gruplarında yapılmalıdır. Eğer gözlerde değişiklik tespit edilirse veya klinik belirtiler ihtiyaç olduğunu gösterirse, tüm hayvanlar incelenmelidir. Uzun süreli çalışmalar için ayrıca 13 haftalık bir oftalmolojik çalışma yürütülmelidir. Eğer bu veriler daha önceki benzer süreli ve benzer doz seviyeli diğer çalışmalardan elde edilmişse oftalmolojik incelemelerin yürütülmesine gerek yoktur.

1.6.4. Hematoloji ve klinik biyokimya

Nörotoksisite çalışmaları, tekrarlı doz sistemik toksisite çalışmalarıyla birlikte yürütüldüğü zaman hematolojik incelemeler ve klinik biyokimya belirlemeleri sistemik toksisite çalışmasıyla ilgiliyöntemde beyan edildiği şekilde yürütülmelidir. Örneklerin toplanması nörodavranış üzerindeki herhangi bir potansiyel etkinin en aza indirildiği bir yolla yapılmalıdır.

1.6.5. Histopatoloji

Nöropatolojik inceleme, çalşmanın in vivo aşaması süresince yapılan gözlemleri tamamlamak ve genişletmek amacıyla tasarlanmalıdır. En az 5 hayvandan cinsiyet/grup alınan dokular (bakınız Tablo 1 ve bir sonraki paragraf) bilinen perfüzyon ve sabitleme(fiksasyon) teknikleri kullanılarak in situ sabitlenmelidir (bakınız kaynak 3, ünite 5 and kaynak 4, bölüm 50). Gözlenen herhangi bir büyük değişiklik kaydedilmelidir.

Çalışma, tek başına nörotoksisite taranması veya nörotoksik etkilerin karakterize edilmesi çalışması olarak yürütüldüğünde geriye kalan hayvanlar burada tanımlanan prosedürleri ve incelemeleri tamamlayabilecek olan özgün nörodavranışsal (10)(11) nöropatolojik (10)(11)(12)(13), nörokimyasal (10)(11)(14)(15) veya elektrofizyolojik (10)(11)(16)(17)

prosedürler veya histopatolojik inceleme için gerekli hayvan sayısını artırmak için kullanılabilirler. Bu tamamlayıcı prosedürlerin kullanılması, deneysel gözlemler veya olumsuz etkilerin özel bir türü ya da nörotoksisite hedefini işaret ettiği durumlarda dikkate değerdir(2)(3).

Alternatif olarak, geriye kalan hayvanlar tekrarlı doz çalışması yönteminde tarif edildiği şekildeki rutin patolojik değerlendirmeler için kullanılabilirler.

Parafine yatırılmış tüm doku örneklerine hematoksilin ve eozin (H&E) gibi genel bir boyama prosedürü uygulanmalıdır ve mikroskobik inceleme yapılmalıdır. Eğer periferal nöropati belirtileri gözlenirse veya bundan şüphe edilirse, periferal sinir dokularının plastiğe yatırılmış örnekleri incelenmelidir. Klinik belirtiler ayrıca ilave yerlerin incelenmesini veya özel boyama prosedürleri kullanılmasını tavsiye etmektedir. İncelenecek daha fazla yer için rehber (3)(4)'te bulunabilir. Ayrıca, uygun özgün boyalar, özgün tipteki patolojik değişiklikleri göstermek için faydalı olabilir (18).

Merkezi ve periferal sinir sisteminin temsili profilleri histolojik olarak incelenmelidir (bakınız kaynak 3, bölüm 5 ve kaynak 4, bölüm 50). İncelenen alanlar normalde önbeyin, beyin merkezi, hipokampus boyunca bir kesme, ortabeyin, cerebellum, pons, medulla oblongata, optik sinir ve retinayla birlikte göz, omuriliğin servikal ve lumbar bölgesi şişlikleri, dorsal kök ganglia, dorsal ve ventral kök lifleri, proksimal siyatik sinirler, proksimal tibial sinirler (dizde) ve tibial sinir bacak kası dallarını kapsar. Omurilik ve periferal sinir profili hem çapraz hem de enlemsel ve boylamsal profili kapsamalıdır.

Sinir sisteminin vasküler yapısına dikkat edilmelidir. Bir iskelet kası örneği, özellikle de bacak kası, ayrıca incelenmelidir.Hücresel ve lif yapılı bölgelere ve MSS ve PSS 'deki özellikle nörotoksikanlardan etkilendiği bilinen örneklere özel önem gösterilmelidir.

Toksik maddeye maruz kalmadan kaynaklanan nöropatolojik değişikliklerle ilgili rehber, Kaynaklar kısmında bulunabilir (3)(4). Doku örneklerinin basamak basamak incelenmesi tavsiye edilir. Önce yüksek doz grubu kontrol grubuyla karşılaştırılır. Eğer bu gruplardan alınan örneklerde nöropatolojik değişikliklere rastlanmazsa sonraki analize gerek yoktur. Eğer nöropatolojik değişiklikler yüksek doz grubunda görülürse, o zaman ara ve düşük doz gruplarından alınan potansiyel olarak etkilenmiş doku örnekleri kodlanmalı ve sıralı şekilde incelenmelidir.

Nitel incelemelerde nöropatolojik değişikliklerle ilgili herhangi bir kanıt bulunursa, sinir sisteminin tüm bölgelerinde bu değişiklikleri gösteren ikinci bir inceleme yapılmalıdır. Potansiyel olarak etkilenen her bir bölgenin tüm doz gruplarından kesimler kodlanmalı ve bu kod bilinmeden rast gele incelenmelidir. Her bir lezyonun frekansı ve ciddiyeti kaydedilmelidir. Bütün doz gruplarının bölgeleri oranlandıktan sonra, kod kırılabilir ve doz-cevap ilişkisini değerlendirmek için istatiksel analiz yapılabilir. Her bir lezyonun farklı derecelerdeki şiddeti tanımlanmalıdır.

Nöropatolojik bulgular davranışsal gözlemler ve ölçümler, bunun yanında da test maddesiyle ilgili önceki ve eş zamanlı sistemik toksisite çalışmalarından elde veriler bağlamında değerlendirilmelidir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların uygulanması

Her bir veri ayrı ayrı sağlanmalıdır. İlaveten tüm veriler her bir test veya kontrol grubu için testin başındaki hayvan sayısını, test sırasında ölü bulunan veya insani gerekçelerle öldürülen hayvan sayısını ve ölüm veya öldürülme zamanlarını, toksisite belirtisi gösteren sayıyı, toksik etkilerin başlangıç zamanı, süresi ve şiddeti dahil gözlenen toksisite belirtilerinin tanımlarını, lezyonların türü ve şiddetiyle birlikte lezyon gösteren hayvan sayısını gösteren tablo şeklinde özetlenmelidir.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Çalışmanın bulguları, nörodavranışsal ve nöropatolojik etkilerin (eğer tamamlayıcı incelemeler varsa, yanında nörokimyasal veya elektrofizyolojik etkiler de görülür) ve gözlenen diğer olumsuz etkilerin karşılıklı ilişkisi ve ciddiyeti açısından değerlendirilmelidir. Uygun durumlarda, rakamsal sonuçlar uygun ve genellikle kabul görmüş istatiksel yöntemlerle değerlendirilmelidir. İstatiksel yöntemler çalışma tasarlanırken seçilmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test maddesi
- fiziksel doğası, (izomerizm, saflık ve fizikokimyasal özellikleri dahildir);
- kimlik verileri
- Taşıyıcı (eğer uygunsa)
- taşıyıcı seçimi için gerekçe;

Test hayvanları:
- kullanılan tür/ırk;
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti;
- kaynak, barınma koşulları, diyet. vs.;
- testin başında her bir hayvanın ayrı ayrı ağırlığı,

Test koşulları:
- test maddesinin formülasyonu/diyet hazırlanması, ulaşılan konsantrasyon, preparatın kararlılığı ve homojenliğiyle ilgili detaylar;
- uygulanan dozun spesifikasyonu, taşıyıcıyla ilgili detaylar dâhil, uygulanan maddenin hacmi ve fiziksel formu;
- test maddesi uygulanmasıyla ilgili detaylar;
- seçilen doz seviyeleri için gerekçe;
- maruz kalma süresi ve yolu için gerekçe;

- eğer uygulanabiliyorsa, diyet/içme suyu test maddesi konsantrasyonunun (ppm) mevcut doza (mg/kg vücut ağırlığı/gün) çevrilmesi;
- gıda ve su kalitesiyle ilgili detaylar;

Gözlemler ve Test Prosedürleri:
- her bir gruptaki hayvanların perfüzyon altgruplarına ayrılmasıyla ilgili detaylar;
- sayma sistemiyle ilgili ölçütler ve sayma skalası dahildir;
- fonksiyonel testlerle ilgili detaylar, farklı yaklaşımları uyarıcı duyusal reaktivite için, (ör.işitsel, görsel ve propriyoseptif); eklemlerin kavrama gücünün değerlendirilmesi için; motor aktivite değerlendirmesi için (aktiviteyi tayin eden otomatik aletler dahil) ve kullanılan diğer prosedürler;
- oftalmolojik incelemelerle ilgili detaylar ve uygunsa ilgili taban çizgisi değerleriyle birlikte hematolojik incelemeler ve klinik biyokimya testleri;
- özel nörodavranışsal, nöropatolojik, nörokimyasal veya elektrofizyolojik prosedürler

Sonuçlar:
- vücut ağırlığı ve vücut ağırlığı değişiklikleri;
- eğer uygulanabiliyorsa, gıda ve su tüketimi
- cinsiyete ve doza göre toksik cevap verileri;
- detaylı klinik gözlemlerin (tersinir olup olmadığı), doğası, şiddeti ve süresi (başlama ve gidişat);
- tüm fonksiyonel test sonuçlarının detaylı tanımları;
- nekropsi bulguları;
- tüm nörodavranışsal, nöropatolojik ve nörokimyasal veya elektrofizyolojik bulguların detaylı tanımları, eğer mevcutsa;
- soğurum ve metabolizma verileri, eğer mevcutsa;
- uygun yerlerdesonuçların istatiksel uygulamaları

Sonuçların tartışılması;
- doz cevap bilgisi
- test kimyasalının nörotoksik potansiyeli hakkındaki nihai kararla herhangi başka bir toksik etkinin ilişkisi;
- herhangi bir olumsuz etkinin gözlemlenmediği seviye.

Sonuçlar
- test kimyasalının nörotoksisitesiyle ilgili özgün bir ifadesi teşvik edilir.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.
(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/ London.
(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003. 16.6.2004 EN Official Journal of the European Union L 216/261
(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.
(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.
(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.
(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Nörotoksikological Assessments. Nörotoksikol. Teratol., 13, 599-609.
(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.
(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.
(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.
(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.
(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.
(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.
(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in
Neurotoxicology.In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299- 335.
(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology.. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.
(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

TABLO 1

Nörotoksisite çalışması bağımsız olarak veya çalışmalarla birlikte yürütüldüğünde grup başına ihtiyaç duyulan hayvan sayısı

	NÖROTOKSİSİTE ÇALIŞMASI YÜRÜTME ŞEKLİ			
	Bağımsız çalışma	28 günlük çalışmayla birleştirilmiş çalışma	90 günlük çalışmayla birleştirilmiş çalışma	Kronik Toksisite çalışmasıyla birleştirilmiş çalışma
Grup başına düşen toplam hayvan sayısı	10 erkek ve 10 dişi	10 erkek ve 10 dişi	15 erkek ve 15 dişi	25 erkek ve 25 dişi
Detaylı klinik gözlemler de dahil fonksiyonel testler için seçilen hayvan sayısı	10 erkek ve 10 dişi	10 erkek ve 10 dişi	10 erkek ve 10 dişi	10 erkek ve 10 dişi
in situ perfüzyon ve nörohistopatoloji başına seçilen hayvan sayısı	5 erkek ve 5 dişi	5 erkek ve 5 dişi	5 erkek ve 5 dişi	5 erkek ve 5 dişi
İlgili rehber dokümanlarda belirtildiği gibi, tekrarlı doz/subkronik/kronik toksisite gözlemleri, hematoloji, klinik biyokimya, histopatoloji, vs. için seçilen hayvan sayısı		5 erkek ve 5 dişi	10 erkek † ve 10 dişi †	20 erkek † ve 20 dişi †
Uygunsa, tamamlayıcı gözlemler	5erkek ve 5 dişi			
† Nörotoksisite çalışmalarının bir parçası olarak, fonksiyonel test uygulamaları ve detaylı klinik gözlemler için seçilen beş hayvanı içerir.				

TABLO 2

Klinik gözlem ve fonksiyonel testlerin frekansı

Gözlem türleri		Çalışma uzunluğu			
		Akut	28-gün	90-gün	Kronik
Tüm hayvanlarda	Genel sağlık durumu	Günlük	Günlük	Günlük	Günlük
	Ölüm/hastalık	Günde iki defa	Günde iki defa	Günde iki defa	Günde iki defa
Fonksiyonel gözlemler için seçilen hayvanlarda	Detaylı klinik gözlemler	- ilk maruz kalmadan önce -8 saatlik dozlama içinde tepe etkisinin yaklaşık zamanında - dozlamadan sonra 7.günde ve 14.günde	- ilk maruz kalmadan önce -daha sonra haftada bir kez	-ilk maruz kalmadan önce Maruz kalmanın ilk ya da ikinci haftası daha sonra aylık	-ilk maruz kalmadan önce Maruz kalmanın ilk ya da ikinci haftası daha sonra üç aylık
	Fonksiyonel testler	- ilk maruz kalmadan önce - 8 saatlik dozlama içinde tepe etkisinin yaklaşık zamanında - dozlamadan sonra 7.günde ve 14.günde	-ilk maruz kalmadan önce -ilk 4 hafta içinde maruz kalmanın sonuna en yakın sürede	-ilk maruz kalmadan önce maruz kalmanın ilk ya da ikinci haftası daha sonra aylık	-ilk maruz kalmadan önce maruz kalmanın ilk ya da ikinci haftası daha sonra üç aylık

B.44 DERİ ABSORPSİYONU:İN VİVO YÖNTEMİ

1. YÖNTEM

Bu test yöntemi OECD TG427(2004) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Kimyasallara maruz kalma genellikle deri *yoluyla* gerçekleşirken laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan toksikolojik çalışmaların birçoğunda ağız yoluyla uygulanmaktadır. Bu yöntemde açıklanan *invivo*deriden absorbsiyon çalışması, dermal maruz kalmayı takiben güvenlik değerlendirmesinde tahmini değerlerin oral çalışmalardan hesaplanmasında iyi bir bağlantı sağlar.

Maddenin, bir sirkülasyona ulaşabilmesinden önce ciltte bulunan çok sayıdaki hücre katmalarını aşması gerekmektedir. Birçok madde için belirleyici katman oranı, ölü hücrelerden oluşan korundur (stratum corneum). Cilt yoluyla geçirgenlik, maddenin moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu gibi faktörlere ek olarak hem kimyasalın lipofilisitesine hem de epidermisin dış katman kalınlığına bağlıdır.Genellikle, kobay farelerinin (guinea pigs) ve maymunlarının cildi insan cildine daha benzer ikentavşan ve sıçanların cildi, insanların cildinden daha geçirgendir.

Ciltten absorpsiyon ölçme yöntemi, in vivo ve in vitro olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Çeşitli laboratuvar türlerinde yapılan in vivo yöntem, emilimi üzerine faydalı bilgiler sağlayabilir. İn vitro yöntem, son zamanlarda geliştirilen bir yöntemdir.Bu yöntem, hayvan ya da insanların tam ya da kısmen kalın cildinden sıvı haznesine geçmesini sağlar. İn vitro yöntem farklı test yöntemlerinde açıklanmaktadır (1). Hem in vivo hem de in vitro yöntemlerin uygunluğu üzerine daha detaylı bilgi sağladığı için, gösterilen durum içerisinde en uygun yöntemin seçiminde yardımcı olması amacıyla Cilt Absorpsiyonu Çalışmalarının Yürütülmesi için OECD Kılavuz Dokümanlarına(2) danışılması tavsiye edilmektedir.

Bu yöntemde açıklanan in vivo yöntem, cilt yolu ile sistemik bölge içerisine nüfuz eden test maddesinin belirlenmesine olanak sağlar.Tekniğin yıllardır yaygın bir kullanımı vardır(3)(4)(5) (6)(7). İn vitro ciltten absorpsiyon çalışmaları birçok uygun durumlarda yapılabilmesine rağmen bazı durumlarda sadece in vivo çalışma gerekli olan veriyi sağlayabilir.

Fizyolojik ve metabolik olaraksağlamsistem kullanması,birçok toksisite çalışmalarına özgün türler kullanması vediğer türler ile kullanımı için değiştirilebilmesi in vivo yöntemin avantajlarıdır. Canlı hayvanların kullanılması, güvenilir sonuçlara olanak sağlayan radyoaktif olarak işaretlenmiş maddelere ihtiyaç duyulması, başlangıç absorpsiyon fazını belirlemede karşılaşılan zorluklar ve tercih edilen türler (sıçanlar) ile insan cildinin geçirgenliğindeki farklılıklar ise dezavantajlarıdır. Hayvan cildi genellikle daha geçirgendir ve buna bağlı olarak insan cilt absorpsiyonu abartılabilmektedir (6) (8) (9). Kostik/aşındırıcı maddeler canlı hayvanlarda test edilmemelidir.

1.2. Tanımlar

Absorbe olmayan doz: maruz kalmadan sonra cilt yüzeyinden yıkanan ve oklüzif olmayan örtü üzerinde bulunan ve maruz kalma esnasında buharlaşan dozu temsil eder.

Absorbe olan doz (in vivo): cilt bölgesindeki uygulamanın bitiminden sonra idrar, kafesin yıkanması,dışkı, solunmuş hava (eğer ölçülmüş ise), kan, dokular (eğer toplanmış ise)ve kalan kadavra, içerisinde bulunanlardan oluşur.

Absorbe edilebilir doz:yıkandıktan sonra cilt üzerinde ya da içerisinde kalanı temsil eder.

1.3. Test Yönteminin İlkeleri

Tercihen radyoaktif olarak işaretlemiş test maddesi, kullanılmakta olan örnek karışımı temsil edecek şekilde bir ya da daha fazla uygun doz seviyelerinde tüyleri kesilmiş hayvan cildine uygulanır. Test karışımının, ağızdan alınımını önlemek amacıyla uygun bir örtü altında (yarı-oklüzif ya da oklüzif) belirli bir süre boyunca cilt ile temas halinde kalması sağlanır. Maruz kalma süresinin bitiminde örtü kaldırılır ve cilt uygun temizlik ürünü ile temizlenir. Bu örtü ve temizleyici maddeler, analiz için tutulur ve cildin üzeri yeni bir örtü ile kapatılır. Hayvanlar, maruz kalmadan önce, maruz kalma esnasında ve sonrasında, ayrı metabolik kafeslerde barındırılır, dışkı ve solunmuş hava analiz için saklanır. Uçucu radyoaktif metabolitlerin az yada hiç oluşmadığına dair yeterli bilgi varsa solunmuş hava toplanmayabilir. Her çalışma normal olarak test karışımına maruz bırakılacak olan birçok hayvan grubunu içerir. Bu hayvanların bir grubu maruz kalma süresinin sonunda öldürülür. Diğer gruplar ise belirlenen zaman aralıklarında öldürülür (2). Örnekleme sonunda kalan hayvanlar öldürülür, analiz için kan toplanır, uygulama alanı analiz için alınır ve kadavra vücuttan atılmamış maddeler için analiz edilir. Numuneler uygun yöntemler ile test edilir ve cilt absorpsiyonu seviyesi tahmin edilir (6) (8) (9).

1.4. Yöntemin Tanımı

1.4.1. Hayvan türlerinin seçimi

Sıçan en yaygın kullanılan türlerdendir, fakat insan deri absorpsiyon oranına daha benzer olan tüysüz türler ve cinsler de kullanılabilir (3) (6) (7) (8) (9). En yaygın kullanılan laboratuvar türlerinden aynı cinsiyetli (varsayılan cinsiyet erkek) genç-ergin sağlıklı hayvanlar kullanılmalıdır. Çalışmanın başlangıcında kullanılan hayvanların ağırlık değişimleri en az olmalı ve ortalama ağırlığın ±%20'sini geçmemelidir.Örnek olarak, 200g–250g erkek sıçanların, özellikle bu aralığın yarısının üstünde olması uygundur.

1.4.2. Hayvanların sayısı ve cinsiyeti

Bir cinsiyetten en az dört hayvanın olduğu bir grup, her test karışımı ve her bir belirlenmiş bitiş süresi için kullanılmalıdır. Her hayvan grubu, örneğin maruz kalma süresi (genellikle 6 ya da 24 saat) bitiminde ve sonraki durum (örneğin 48 ve 72 saat) gibi farklı zaman aralıklarından sonra öldürülür. Eğer erkek ve dişiler arasındaki dermal toksisitedeki önemli farklılıkları gösteren mevcut veri var ise daha duyarlı cinsiyet seçilmelidir. Eğer bu gibi veriler yok ise daha sonra her iki cinsiyetten biri kullanılabilir.

1.4.3. Barınma ve besleme koşulları

Deney hayvanları için oda sıcaklığı 22°C (± 3°C) olmalıdır. Ayrıca, bağıl nem oranı en az %30 olmalı ve tercihen odanın temizlenmesi sırası dışında, %70'i geçmemelidir, hedef % 50-60 olmalıdır. Yapay ışık sistemi kullanılmalı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık şeklinde

olmalıdır. Besleme için, geleneksel laboratuvar yiyecekleri kullanılabilir ve bu yiyecekler limitsiz içme suyu ile birlikte kolayca ulaşılabilir olmalıdır.Çalışma esnasında ve tercihen çevreye uyum sağlama esnasında da, hayvanlar, metabolik kafeslerde ayrı ayrı barındırılmalıdır. Yiyecek ve su taşması sonuçları etkileyebileceği için bu gibi durumların olma olasılığı en aza indirilmelidir.

1.4.4. Hayvanların hazırlanması

Hayvanlar bireysel olarak tanınmaları için işaretlenir ve laboratuvar koşullarına uyum sağlaması için çalışma başlangıcından en az beş gün önce kafeslerine konur.

Çevre koşullarına uyum sağlama sürecini takiben, doz uygulamasından yaklaşık olarak 24 saat önce her hayvanın omuz ve arka kısmındaki belirli alanlardaki tüyler kesilir. Zarar görmüş ciltteki geçirme özellikleri sağlam ciltten farklıdır ve cildin aşınmadan korunması için dikkat edilmelidir. Tüylerin kesilme işleminden sonra, test maddesini cilde uygulanmadan yaklaşık 24 saat önce (Bkz. Bölüm1.4.7)cilt yüzeyi, sebumu ortadan kaldırmak için aseton ile silinmelidir. İlave sabun ve suyla yıkama tavsiye edilmemektedir,çünkü herhangi bir sabun kalıntısı test maddesinin absorpsiyonunu kolaylaştırabilir. Uygulama alanı, cildin her cm^2lik alanı için, absorbe edilen test kimyasalının miktarının güvenilir bir şekilde hesaplanmasına izin verecek kadar, tercihen 10 cm^2, geniş olmalıdır. 200-250gr vücut ağırlığı olan sıçanlar bu uygulama alanı için uygundur. Hazırlık aşamasından sonra hayvanlar metabolik kafeslerine tekrar konur.

1.4.5. Test maddesi

Test maddesi, cilde nüfuz etme özellikleri çalışılacak olan bir öğedir. Tercihen, test maddesi radyoaktif olarak işaretlenmelidir.

1.4.6. Test karışımı

Test maddesi karışımı (örn. cilde uygulanan saf, seyreltilmiş ya da test kimyasalı içeren formülasyon), insanların ve diğer potansiyel hedef türlerin maruz kalabilecekleri karışımla aynı (ya da gerçeğine uygun) olmalıdır. Test karışımında, herhangi bir farklılık olması durumunda bu gerekçelendirilmelidir. Gerekli olduğunda, test maddesi uygun bir aracı içinde çözündürülür ya da dağıtılır. Sudan başka kullanılan diğer aracıların absorpsiyon özellikleri ve test maddesi ile olası etkileşimi bilinmelidir.

1.4.7. Cilde uygulanması

Cilt yüzeyinde uygulama yapılacak alan belirlenir. Bu alana miktarı bilinen test karışımı eşit miktarda uygulanır.Bu miktar normal olarak olası insan maruz kalmasında, genellikle katılar için 1-5 mg/cm2, sıvılar için 10 $\mu l/cm^2$'ye kadardır. Diğer miktarlar, öngörülen kullanım koşullarına, çalışmanın amacına veya test karışımının fiziksel özelliklerine bağlı olarak gerekçelendirilmelidir. Uygulamayı takiben, temizlenmiş alan tımarlanmadan korunmalıdır. Tipik cihaz örneği Şekil 1 de gösterilmektedir. Normal olarak uygulama alanı oklüzif olmayan örtüyle (örn. geçirgen naylon tül örtü) korunacaktır. Bununla birlikte sonsuz uygulamalar için uygulama alanı kapalı olmalıdır (oklüzif). Yarı uçucu test maddesinin buharlaşarak test maddesinin geri kazanım oranını kabul edilemeyecek düzeyde azaltması (ayrıca bkz. Bölüm 1.4.10, ilk paragraf) durumunda, uygulama cihazını aktif karbon filtre ile örterek buharlaşan test maddesini yakalamak gerekir (bkz. Şekil 1). Uygulama cihazının cilde

zarar vermemesi, test karışımını absorbe etmemesi ve test karışımı ile etkileşime girmemesi gerekir. Hayvanlar dışkılarını toplamak için ayrı metabolik kafeslerine tekrar konur.

1.4.8. Maruz kalma süresi ve örnekleme

Maruz kalma süresi, uygulamanın başlangıcı ile test karışımının yıkanarak ciltten uzaklaştırılması arasında geçen zaman aralığıdır. Beklenilen insan maruz kalma süresine dayalı olarak ilgili maruz kalma zaman aralığı (genellikle 6 ya da 24 saat) kullanılmalıdır. Maruz kalma süresini takiben, hayvanlar belirlenen sonlandırma işlemine kadar metabolik kafeslerde muhafaza edilmelidir. Hayvanlarda, çalışma boyunca düzenli aralıklarda toksisite/anormal reaksiyonların belirtileri gözlemlenmelidir. Maruz kalma sürecinin bitiminde temizlenen cilt, görülebilir cilt tahrişi belirtileri için gözlemlenmelidir.

Metabolik kafesler, çalışma süresince idrar ve dışkıların ayrı toplanmasına olanak sağlamalıdır. Ayrıca kafesler, belirli miktarda üretildiklerinde (> % 5) analiz edilmesi gereken 14C- karbon dioksit ve uçucu 14C- karbon bileşiklerinin toplanmasına da uygun olmalıdır. İdrar, dışkı ve tutucu sıvılar (örn. 14C- karbon dioksit ve uçucu 14C- bileşikleri), her örnekleme sürecinde her gruptan ayrı olarak toplanmalıdır. Uçucu radyoaktif metabolitlerin az oluştuğuna ya da hiç oluşmadığına dair yeterli bilgi var ise açık kafesler kullanılabilir.

Dışkı, ilk cilt teması başlangıcından 24 saate kadar ve sonra günlük olarak deney bitimine kadar maruz kalma sürecinde toplanır. Belirli zaman aralıklarında normal olarak üç kez dışkı toplanması yeterli iken, test karışımının öngörülen amacı ya da mevcut kinetik veri, çalışma için daha uygun ya da ilave süre önerebilir.

Maruz kalma sürecinin bitiminde koruyucu aparat her hayvandan alınır ve analiz için ayrı olarak tutulur. Bütün hayvanların uygulama yapılan cilt bölgesi, uygun bezler kullanarak temizlik ajanı ile en az üç kez temizlenir. Vücudun diğer kısımlarına bulaşmasını engellemek için gerekli önlemler alınmalıdır. Temizlik ürünü, örneğin sıvı sabun çözeltisi gibi tipik normal hijyen uygulamasında kullanılan temizlik ajanı olmalıdır. Sonunda cilt kurutulmalıdır. Bütün bezler ve çamaşırlar analiz edilmek üzere tutulmalıdır. Sonraki aşamalar için grupları oluşturacak bu hayvanların kendi kafeslerine götürülmeden önce temizlenen bölgelerini korumak için, yeni örtüler kullanılmalıdır.

1.4.9. Sonlandırma prosedürleri

Her grup için, ayrı hayvanlar belirlenen zamanda öldürülmeli ve kanları analiz edilmek üzere toplanmalıdır. Koruyucu aparat ya da örtü, analiz edilmek üzere tutulmalıdır. Her bir hayvanın belirlenen uygulama bölgesinden ve doz uygulaması yapılmamış benzer bölgesinden deri alınarak farklı analizlerde kullanılır. Test kimyasalının eğilimi hakkında daha fazla bilgi sağlamak amacıyla bilinen epidermisten korunu (stratum corneum) ayırmak için uygulama alanı bölünebilir. Maruz kalma sürecinden sonraki süreç içinde test kimyasalının eğiliminin belirlenmesi test kimyasalının stratum corneum içindeki davranışı ile ilgili bazı belirtileri sağlamalıdır. Cilt bölünmesini kolaylaştırmak için (son cilt temizliği ve hayvanın öldürülmesinden sonra) koruyucu örtü kaldırılır. Uygulama alanındaki cilt, cildi çevreleyen dairesel halkalar ile birlikte sıçandan kesilip çıkartılır ve tahta üzerine iğnelenir. Yapışkan bant şerit, nazikçe bastırılarak cilt yüzeyine uygulanır ve korun (stratum corneum) bant ile alınır. Bütün korunlar (stratum corneumlar) alınana ve ardışık bant şeritleri cilt yüzeyine yapışmayıncaya kadar uygulamaya devam edilir. Her hayvan için, bütün bant çubukları bir kapta toplanır ve korunu (stratum corneum) çözmek için doku parçalayıcı

eklenir. Artık kadavratarafından yapılan absorpsiyon dozu analiz etmeden önce herhangi bir potansiyel hedef doku ayrı ölçüm için saklanabilir. Her bir hayvan cesedi analiz için saklanmalıdır. Genellikle toplam içeriğin analizi yeterli olacaktır. Hedef organlar ayrı analizler için saklanabilir (diğer çalışmalarda belirtilmiş ise). Hayvanların planlanmış sonlanma esnasında idrar kesesi içinde bulunan idrar, önceden toplanan idrara eklenmelidir. Belirlenmiş ölüm esnasında metabolik kafeslerden dışkı toplanmasından sonra, kafesler ve tutucular uygun çözücü ile yıkanmalıdır. Diğer potansiyel kirlenmiş malzemeler aynı şekilde analiz edilmelidir.

1.4.10. Analiz

Bütün çalışmalarda uygun geri kazanım (örn. ortalama radyoaktivite % 100 ± 10) olmalıdır. Bu oranın dışında elde edilen geri kazanımlar ise gerekçelendirilmelidir. Her numunede uygulanan doz miktarı, uygun onaylanmış prosedürlerle analiz edilmelidir.

İstatiksel değerlendirmeler, her bir uygulamadaki tekrarlar için varyans ölçümünü içermelidir.

2. VERİ

Aşağıdaki ölçümler, her bir hayvan için tüm örneklemelerde test kimyasalı ve/veya metabolitler için yapılmalıdır. Her bir veriye ek olarak, numuneleme zamanlarına göre gruplanmış veri, rapor edilmelidir.

— koruyucu araçlardan elde edilen miktar,
— ciltten çıkartılabilen miktar,
— cilt içinden/üstünden temizlenemeyen miktar,
— kan numunesi içindeki miktar,
— dışkı ve solunmuş hava içindeki miktar (eğer uygun ise),
— ayrı analizler için alınmış karkas ve herhangi bir organ içindeki kalan miktarı.

Dışkı, solunmuş hava, kan ve karkas içindeki test maddesi ve/veya metabolit miktarı, belirlenmiş zamanlarda absorbe edilen toplam miktarın belirlenmesini sağlayacaktır. Maruz kalma süresi boyunca test maddesine maruz kalan cildin her cm^2 alanında absorbe edilen test kimyasalı miktarının hesaplaması yapılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test Raporu

Test raporu, kullanılan test sisteminin doğrulanmasını da içeren test protokolünde belirtilen koşullar ile birlikte aşağıdakileri kapsamalıdır:

Test maddesinin:
- kimliği (örn. CAS numarası, varsa kaynak, saflık (radyoaktif kimyasalın saflığı), bilinen safsızlık, parti numarası),

- fiziksel yapısı, fizikokimyasal özellikleri (örn. pH, uçuculuk, çözünürlük, kararlılık, moleküler ağırlık ve log Pow).

Test karışımı:
- formülasyon ve kullanımın gerekçelendirmesi,
- test karışımının detayları, uygulanan miktar,erişilen konsantrasyon, taşıyıcı,kararlılıkve homojenlik.

Test hayvanı:
- kullanılan tür/cins,
- hayvanların sayısı, yaşı ve cinsiyeti,
- hayvanların kaynağı,barınma koşulları,beslenmeleri,vb.,
- test başlangıcında her bir hayvanın ağırlığı.

Test koşulları:
- test karışımının uygulama detayları (uygulama alanı, analiz yöntemleri, oklüzyon/oklüzyon olmayan, hacim, özütleme, tespit),
- yiyecek ve su kalitesinin detayları.

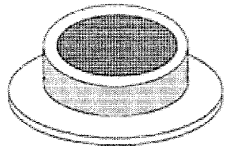
Sonuçlar:
- herhangi bir toksisite belirtisi,
- absorpsiyon verilerinin tablosu (oran, miktarya da yüzde olarak),
- deneyin tüm geri kazanımı,
- sonuçların yorumlanması, test bileşiğinin mevcut cilt absorpsiyon verileri ile karşılaştırılması.

Sonuçların tartışılması.
Sonuç.

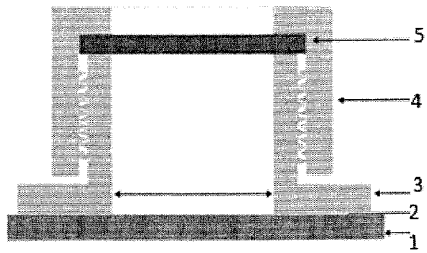
4. KAYNAKLAR

(1) Test Yöntemi B.45.Cilt Absorpsiyonu:In vitro Yöntem.
(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris
(3) ECETOC, (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicologyand Toxicologyof Chemicals, MonographNo 20.
(4) Zendzian R.P. (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. Am. Coll. Toxicol. 8(5),p. 829-835.
(5) Kemppainen, B.W., Reifenrath WG(1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
(6) EPA, (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
(7) EPA, (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.
(8) Bronaugh, R.L., Wester, R.C., Bucks,D., MaibachH.I. and Sarason,R., (1990) In vivo percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. Fd. Chem. Toxic. 28,p. 369-373.

(9) Feldman, R.J. and Maibach, H.I., (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. Invest Dermatol. 54,p. 399-404.



1: Cilt/deri
2: Japon yapıştırıcısı
3: Vida dişli taban
4: Vida dişli başlık/kapak
5: Aktif kömür filtresi veya tel filtre



Şekil 1

İn vivo ciltten emilim çalışmaları esnasında dermal uygulama alanının tanımlanması ve korunması için kullanılan genel aygıtın tasarım örneği

B.45. DERİ ABSORPSİYONU:İN VİTRO YÖNTEMİ

1. YÖNTEM

Bu test yöntemi OECD TG428(2004) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu yöntem, kesilen deriye uygulanacak test maddesi absorpsiyonu hakkında bilgi elde etmek için tasarlanmıştır. Bu yöntem, cilt absorpsiyonu için: in vivo yöntem (1) ile birlikte veya ayrı olarak yürütülebilir. Bu yönteme bağlı olarak çalışmaların düzenlenmesinde yardımcı olması amacıyla Cilt Absorpsiyonu Çalışmalarının Yürütülmesi için OECD Kılavuz Dokümanlarına(2) danışılması tavsiye edilmektedir. Bu yöntemle elde edilecek olan sonuçların güvenilirliğini sağlayacak uygun in vitro prosedürlerin seçimi için belirli koşullarda kullanmak üzere bu Kılavuz Doküman hazırlanmıştır.

Cilt absorpsiyonunu ve ciltten dağılımı ölçme yöntemleri iki kategoriye ayrılabilir: in vivo ve in vitro. Cilt absorpsiyonu üzerine in vivo yöntemler iyice anlaşılmış ve hayvan türlerinden farmakokinetik bilgi sağlanmıştır. İn vivo yöntem bir diğer test yönteminde (1) ayrı olarak açıklanmıştır. İn vitro yöntemler, yıllardır cilt absorpsiyonu ölçümü için kullanılmaktadır. Bu test yöntemiyle keşfedilen in vitro yöntemlerin resmi onaylama çalışmaları henüz yapılmamasına rağmen, 1999'da OECD uzmanları in vitro yöntemini (3) destekleyici değerlendirmelerde etkili veri sağlandığı konusunda anlaşmışlardır. Bu desteği ispatlamak amacıyla, kayda değer sayıda in vitro ve in vivo yöntemlerin doğrudan karşılaştırılmalarını içeren daha fazla detay, Kılavuz Doküman (2) ile sağlanmaktadır. Bu konuyu inceleyen ve in vitro yöntem kullanımı üzerine detaylı bir bilgi sağlayan çok sayıda belge bulunmaktadır (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). In vitro yöntemler, kimyasalların cilt içinden ve üzerinden sıvı rezervlerine dağılmasını ölçer ve canlı olmayan cildi kullanabilir; sadece dağılma ölçümü ya da dağılma ölçümü ile eşzamanlı cilt metabolizması ölçümü için taze, metabolik olarak aktif cilt kullanabilir. Bu yöntemler, farklı formülasyonlardan kimyasalların cilt içinden ve yoluyla gönderilmesini karşılaştırmak için tarama olarak özel kullanım bulmuştur ve insanlarda ciltten emilimin değerlendirilmesi için kullanışlı modeller de sağlayabilir.

İn vitro yöntem, bütün durumlar ve kimyasal sınıflar için kullanılamayabilir. Cilt içine işleme durumunun ilk sayısal değerlendirmesi için in vitro test yöntemini kullanmak mümkündür. Bazı vakalarda bunu in vivo veriler ile takip etmek gerekli olabilir. İn vitro yöntemin uygun olabileceği durumlarla ilgili daha fazla ayrıntı için Kılavuz Dökümana (2) başvurulmalıdır. Kararın desteklenmesi amacıyla ilave detaylı bilgi (3) de sağlanmaktadır. Bu yöntem cilt absorpsiyonu ölçümü için prensipleri ve kesilen cilt kullanarak test maddesinin nasıl uygulanacağını gösterir. İnsan cildini de içeren birçok memeli türünden alınmış cilt kullanılabilir. Cildin geçirgenlik özellikleri, cilt vücuttan kesildikten sonra elde edilir çünkü esas dağılma bariyeri canlı olmayan korundur (stratum corneum); cilt yoluyla aktif kimyasal madde taşınımı henüz tespit edilmemiştir. Cildin, absorpsiyon esnasında (6) bazı kimyasalları metabolize etme özelliği olduğu bilinmektedir. Fakat bu süreç asıl absorbe edilen doz açısından hız sınırlayıcı değildir ancak yine de kan dolaşımına giren maddenin yapısını etkileyebilir.

1.2. Tanımlar

Absorbe edilmemiş doz: maruz kalmadan sonra cilt yüzeyinden temizlenen ve maruz kalma esnasında ciltten buharlaşarak oklüzif olmayan örtü üzerinde biriken dozun tümü

Absorbe edilmiş doz (in vitro): belirli bir süre içerisinde alıcı sıvıya veya dolaşım sistemine ulaşmış test maddesi kütlesi

Absorbe edilebilen doz (in vitro):yıkandıktan sonra cilt üzerinde ya da içerisinde kalanıtemsil eder.

1.3. Test Yöntemi Kuralları

İstenildiği takdirde radyoaktif olarak işaretlenebilen test maddesi, difüzyon hücresinin iki kısmını ayıran cilt numunesinin yüzeyine uygulanır. Kimyasal, uygun temizleme prosedürleriyle kaldırılmadan önce belirli koşullar altında belirli bir süre cilt yüzeyinde kalır. Alıcı sıvı, deney boyunca değişik zaman noktalarında numunelenir ve test kimyasalı için analiz edilir ve/veya metabolize edilir.

Aktif metabolik sistemler kullanıldığında, test kimyasalının metabolizasyonu uygun yöntemler kullanarak analiz edilebilir. Uygun olduğunda, deneyin bitiminde test kimyasalının ve metabolitlerinin dağılımı nicelik açısından ölçülebilir.

Bu yöntem içinde ve Kılavuz Doküman (2) içinde açıklanan uygun koşullar kullanılarak, verilen zaman süresinde test maddesinin absorpsiyonu, alıcı sıvının ve doz uygulanan cildin analizi ile ölçülebilir. Absorpsiyonun, sadece alıcı sıvının ölçümünden belirlenebileceği kanıtlanamaz ise cilt içinde kalan test maddesi, absorbe edilmiş kabul edilir. Diğer bileşenlerin analizi (cilt yüzeyinden yıkanan ve cilt tabakaları arasında kalan materyaller), toplam test maddesi yapısı ve kısmi iyileşmeyi de içeren ileri veri değerlendirmelerinin yapılabilmesini sağlar.

Testin yapıldığı laboratuvardaki test sisteminin performansını ve güvenilirliğini kanıtlamak için ilgili referans kimyasalların sonuçları mevcut olmalı ve kullanılan yöntem için yayımlanmış kaynaklar ile uygun olmalıdır. Bu gerekliliği yerine getirmek için test maddesi ile aynı zamanda uygun bir referans maddesi (test maddesine yakın lipofilisiteli olması tercih edilir) test edilebilir veya farklı lipofilisiteli birkaç referans maddesi (örn. kafein, benzoik asit ve testosteron) hakkında yeterli bilgi sağlanabilir.

1.4. Yöntemin Tanımı

1.4.1. Difüzyon hücresi

Difüzyon hücresi, cildin aralarında konumlandığı bir alıcı bölme ve bir verici bölmeden oluşur (Şekil 1 de genel olarak tasarım örneği gösterilmektedir). Hücre, cildin etrafında iyi bir yalıtım oluşturmalı ve kolay numune alınmasına, alıcı çözeltinin cildin alt kısmı ile temas halinde olup iyice karışabilmesine, hücrenin ve içindekilerin sıcaklık kontrolünün iyi yapılmasına olanak sağlamalıdır. Statik ve sürekli akışlı difüzyon hücrelerinin her ikisi de kabul edilebilir. Normal olarak verici bölmeleri, maruz kalma esnasında test karışımının sınırlı dozu için tam kapatılmadan bırakılır. Bununla birlikte sınırsız dozlar ve bazı sınırlı doz uygulama senaryoları için alıcı bölmeleri kapatılabilir.

1.4.2. Alıcı sıvı

Fizyolojik açıdan yardımcı bir alıcı sıvının kullanılması tercih edilir ancak gerekçe gösterilerek diğer sıvılar da kullanılabilir. Alıcı sıvının bileşimi eksiksiz sağlanmalıdır. Absorpsiyona engel teşkil etmemesi için test kimyasalının alıcı sıvıda yeteri kadar çözündüğü gösterilmelidir. Buna ilaveten, alıcı sıvı, deri hazırlama bütünlüğünü etkilememelidir. Sürekli akışlı bir sistemde, akış hızı test maddesinin alıcı sıvıya difüzyonuna engel olmamalıdır. Statik hücre sisteminde, alıcı sıvı devamlı karıştırılmalı ve düzenli olarak numune alınmalıdır. Metabolizma üzerine çalışılıyor ise, alıcı sıvı deney boyunca derinin canlılığını desteklemelidir.

1.4.3. Cilt karışımları

İnsan ya da hayvan kaynaklı cilt kullanılabilir. İnsan cildi kullanımının ulusal ve uluslararası etik anlayış ve şartlara tabi olduğu kabul edilir. Canlı cilt tercih edilmesine rağmen cilt bütünlüğü ispatlandığı takdirde canlı olmayan cilt de kullanılabilir. Dermatom ile hazırlanan epidermal zarlar (enzimle, ısıyla veya kimyasal yolla ayrılmış) veya ayrık kalınlıktaki cilt (tipik olarak 200-400 µm kalınlıkta olan) kabul edilebilir. Tam kalınlıktaki cilt, cilt yüzeyindeki test kimyasalının tespit edilmesi için özel olarak gerekmiyorsa kullanılabilir fakat aşırı kalınlıktan (yaklaşık olarak > 1 mm) kaçınılmalıdır. Türlerin seçimi, anatomik alan ve hazırlayıcı teknik gerekçelendirilmelidir. Her test karışımı için en az dört tekrar testinden gelen kabul edilebilir veri gereklidir.

1.4.4. Cilt karışımının bütünlüğü

Cildin düzgün bir şekilde hazırlanması temel gereksinimdir. Uygun olmayan kullanım koruna (stratum corneum) zarar verebilir bu nedenle hazırlanan derinin bütünlüğü kontrol edilmelidir. Cilt metabolizması üzerine inceleme yapıldığında, taze kesilen cilt mümkün olduğunca erken ve metabolik aktiviyeti desteklediği bilinen şartlar altında kullanılmalıdır. Genel kılavuz olarak, taze kesilen cilt 24 saat içerisinde kullanılmalıdır fakat kabul edilebilir saklama süresi metabolizasyon ve saklama sıcaklıklarını (13) kapsayan enzim sistemine bağlı olarak değişebilir. Cilt karışımı kullanımdan önce saklandığında, bariyer fonksiyonun korunduğunu gösteren kanıtlar sunulmalıdır.

1.4.5. Test maddesi

Test maddesi, nüfuz etme özellikleri çalışılacak olan birimdir. Test maddesi tercihen radyoaktif olarak işaretlenmelidir.

1.4.6. Test karışımı

Test maddesinin karışımı (örn. cilde uygulanan test kimyasalını içeren saf, seyreltilmiş ya da formüle edilmiş materyal), insan ve diğer potansiyel hedef türlerin maruz kalma olasılığı olan madde ile aynı (veya gerçekçi bir benzeri) olmalıdır. Test karışımında, herhangi bir farklılık olması durumunda bu gerekçelendirilmelidir.

1.4.7. Test maddesi konsantrasyonları ve formülasyonları

Normal olarak, test maddesinin, potansiyel insan maruz kalma sınırlarının üst kısımlarını da içine alan birden fazla konsantrasyonu hazırlanır. Aynı şekilde, tipik formülasyon aralığını test etmek de düşünülmelidir.

1.4.8. Cilde uygulanması

İnsanlar normal koşullar altında kimyasallara sınırlı dozlarla maruz kalırlar. Bu nedenle, insan maruz kalmasını taklit eden uygulama biçimi, yani normalde katılar için cildin 1-5 mg/cm2 si, sıvılar için cildin 10 µl/cm2 si kullanılmalıdır. Miktar; beklenen kullanım koşullarıyla, çalışmanın amacıyla ya da test karışımının fiziksel özellikleriyle gerekçelendirilmelidir. Örnek olarak birim alanda geniş hacimler uygulanırsa, cilt yüzeyine sınırsız uygulama yapılabilir.

1.4.9. Sıcaklık

Kimyasalların pasif dağılması (ve buna bağlı cilt absorpsiyonları) sıcaklıktan etkilenir. Difüzyon bölümü ve cilt, normal cilt sıcaklığı olan 32 ± 1 oC'ye yakın olarak sabit sıcaklıkta elde edilmelidir. Farklı hücre tasarımları, alıcının/cildin fizyolojik normda olmasını sağlamak için farklı su banyosu ve ısıtılmış blok sıcaklıkları gerektirir. Nem oranı tercihen % 30 ila %70 arasında olmalıdır.

1.4.10. Maruz kalma ve örnekleme süresi

Cilt, test karışımına bütün test süresi veya daha kısa zaman maruz kalabilir (örn, belirli insan maruz kalma biçimine benzetmek için). Cilt, uygun temizleme ürünü ile test karışımının fazlasından temizlenmeli ve temizlikten kalanlar analiz için toplanmalıdır. Test karışımının temizlenmesi prosedürü, beklenen kullanım koşuluna bağlı olacaktır ve gerekçelendirilmelidir. 24 saatlik bir örnekleme süresi, absorpsiyon profilinin uygun karakterizasyonuna izin vermek için gereklidir. Cilt bütünlüğü 24 saatten fazla bir sürede bozulmaya başlayabileceği için örnekleme süresi 24 saati aşmamalıdır. Bu durum, cilde hızlı bir şekilde nüfuz eden test maddelerinde önemli olmayabilir ancak yavaşça nüfuz eden test maddeleri için daha fazla süre gerekebilir. Alıcı sıvının örnekleme sıklığı, test maddesinin absorpsiyon profilinin grafiksel olarak gösterilimine izin verecek şekilde ayarlanmalıdır.

1.4.11. Son işlemler

Test sisteminin bütün bileşenleri ve belirlenecek bulgular analiz edilmelidir. Bu verici bölümünü, temizlenen cilt yüzeyini, cilt karışımını ve alıcı sıvı/bölümünü içerir. Bazı durumlarda, ayrı analizler yapmak amacıyla cilt, maruz kalmış alanlara ve hücre kenarı altındaki cilt alanına, koruna (stratum corneum), epidermis ve dermis parçalarına ayrılabilir.

1.4.12. Analiz

Bütün çalışmalarda yeterli geri kazanım (hedef, radyoaktivitenin ortalama % 100±10'u olmalı ve herhangi bir sapma gerekçelendirilmelidir.) sağlanmalıdır.

Alıcı sıvı, cilt karışımı, cilt yüzeyi yıkamaları ve durulama aparatlarındaki test maddesi miktarı, uygun teknik kullanarak analiz edilmelidir.

2. VERİ

Alıcı sıvının analizi, test kimyasal maddesinin test sistemindeki dağılımı ve zamanla birlikte absorpsiyon profili sunulmalıdır. Maruz kalmada sonlu dozlar kullanıldığı zaman, ciltten yıkanan miktar, ciltle birleşmiş miktar (ve analiz edilirse farklı cilt tabakalarındaki miktar) ve alıcı sıvı içindeki miktar (uygulanan dozun hızı ve miktarı veya yüzdesi) hesaplanmalıdır. Deri absorpsiyonu, bazen, sadece alıcı sıvı verisi ile ifade edilebilir. Ancak, çalışma sonunda cilt üzerinde test maddesi kalıyorsa, bu da toplam absorbe edilen miktara eklenmelidir (bkz. Referans (3) içinde Paragraf 66). Sonsuz doz koşulları kullanıldığı zaman, veri, geçirgenlik sabitinin (Kp) hesaplanmasına olanak sağlar. Bu gibi durumlarda, absorpsiyon yüzdesi gerekli olmayabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, protokolle düzenlenen gereklilikleri, kullanılan test sistemi için gerekçeyi ve aşağıdakileri içermelidir:

Test maddesi:
- fiziksel yapı, fizyokimyasal özellikleri (en azından: moleküler ağırlık ve log Pow), saflık (radyokimyasal saflık),
- kimlik bilgisi (örn. parti numarası),
- alıcı sıvı içerisindeki çözünürlük.

Test karışımı:
- formülasyon ve kullanım gerekçesi,
- homojenlik.

Test koşulları:
- cilt kaynakları ve alanı, karışım yöntemi, kullanımdan önce saklama koşulları, yapılan bütün ön muameleler (temizlik, antibiyotik tedavisi vb.), cilt bütünlüğü ölçümü, metabolik durum, kullanım gerekçesi,
- hücre tasarımı, alıcı sıvı bileşimi, alıcı sıvının akış hızı ya da numuneleme süreleri ve prosedürleri,
- test karışımı uygulamasının detayları ve uygulanan dozun nicel olarak ölçülmesi,
- maruz kalma süresi,
- test karışımının ciltten kaldırılma detayları, örn. cildin durulanması,
- cilt analizlerinin detayları ve cilt dağılımını göstermek için kullanılan ayrıştırma tekniği,
- hücre ve malzeme temizleme prosedürleri,
- yardımcı yöntemler, çıkarma teknikleri, araştırma sınırları ve analitik yöntem doğrulama.

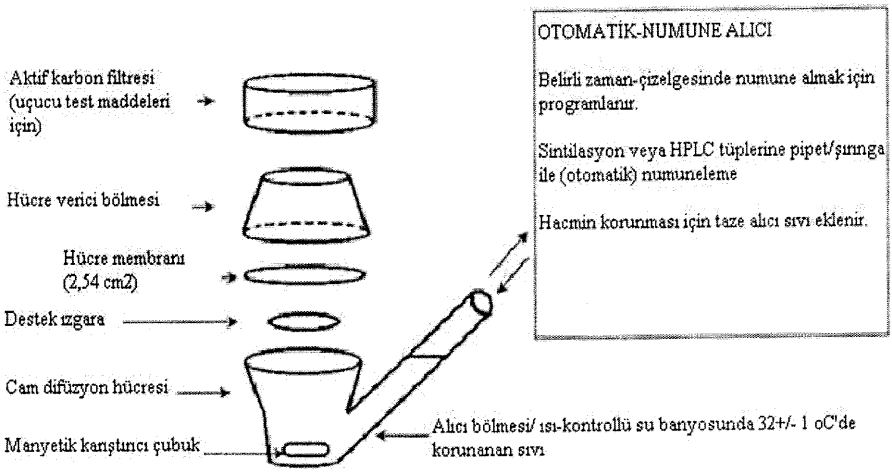
Sonuçlar:
- deneyin bütün bulguları (Uygulanan doz =Ciltten durulananlar + Cilt + Alıcı sıvı + Hücreden durulananlar),
- her bölümdeki ayrı hücre bulgularının tablosu,

- absorpsiyon profili,
- tabloda gösterilmiş absorpsiyon verisi (hız, miktar ya da yüzde cinsinden).

Sonuçların tartışılması.
Sonuç.

4. KAYNAKLAR

(1) Test Yöntemi B.44 Deri Absorpsiyonu: İn Vivo Yöntemi
(2) OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
(3) OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.
(4) Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
(5) Bronaugh R.L. and Collier, S.W., (1991) Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237-241.
(6) Bronaugh R.L. and Maibach H.I., (1991) In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.
(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, (1993) Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W., (1999) Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191-205.
(9) Recommended Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.
(10) Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R. et al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
(11) Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
(12) Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
(13) Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, p. 356-365.



Şekil 1 *İn vitro* ciltten absorpsiyon çalışmaları için statik difüzyon hücresinin tipik tasarım örneği

B.46. İN VİTRO CİLT TAHRİŞİ: YENİDEN YAPILANDIRILMIŞ İNSAN EPİDERMİ MODEL TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Cilt tahrişi, bir test maddesinin 4 saate kadar uygulanmasıyla ortaya çıkan, tersinir bir zarardır (Birleşmiş Milletler'in sınıflandırma ve etiketlemeye ilişkin Küresel Uyumlaştırılmış Sistemi'nde (UN GHS) tanımlanmıştır (1)). Bu test yöntemi, bilgi gerekliliklerine dayanan ve test stratejisi kapsamında bağımsız değiştirme testi olarak cilt hassaslaştırıcılığının belirlemesini sağlayan, delillerin ağırlığı yaklaşımlı *in vitro* prosedüre sahiptir(2).

Cilt tahrişinin değerlendirilmesi, genellikle laboratuvar hayvanlarının kullanımını gerektirir (bkz. Yöntem B.4) (3). Hayvan sağlığı ile ilgili kaygılara ilişkin olarak, yöntem B.4 sıralı test stratejisi uygulanarak geçerliliği kabul edilmiş olan *in vitro* ve *ex vivo* yöntemler kullanan cilt aşındırıcılığının/tahrişinin belirlenmesine izin vererek hayvanların eziyet ve acı çekmesine mani olunur. Geçerliliği kabul edilmiş olan üç *in vitro* test yöntemi ya da test rehberleri, B. 40, B. 40bis ve TG 435 (4, 5, 6), B. 4 ün sıralı test stratejisinin aşındırıcılık bölümü için kullanışlıdır.

Bu test yöntemi, örneğin epidermis gibi insan cildinin üst kısımlarının biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine oldukça benzeyen bütün tasarımlarında (hücre zarı, temsili doku ve sitoarşitektoni olarak epidermis keratinosidden elde edilmiş insani kullanım) yeniden yapılandırılmış insan epidermi modellerine dayalıdır. Bu test yöntemi dahilinde tanımlanan prosedür, UN GHS kategori 2 ile uyumlu tahriş edici maddelerin tehlikelerinin belirlenmesini sağlar. Bu Test Yöntemi, benzer ve değiştirilmiş olan yeniden oluşturulmuş insan epidermisi esaslı test yöntemleri için bir grup performans standardını da içerir (7).

Ön geçerlilik, optimizasyon ve geçerlilik çalışmaları, yeniden yapılandırılmış olan insan epidermis modelleri kullanarak EpiSkin™ ve EpiDerm™ gibi ticari olarak mevcut olan iki in vitro test yöntemi (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) için tamamlanmıştır. Bu referanslar R 38'e dayanır. GHS'nin amaçları için yeniden hesaplamaya dair belli bakış açıları, referans 25 içinde ele alınmıştır. EpiSkin™'e denk performansa sahip yöntemler (geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1), GHS kategori 2 tahriş edici maddelerin sınıflandırılmasında kullanılan tavşan in vivo testi için bağımsız değiştirme test yöntemi olarak tavsiye edilir. EpiDerm™'e denk performansa sahip yöntemler (geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 2), GHS kategori 2 tahriş edici maddelerin sınıflandırılmasında kullanılan tarama test yöntemi olarak ya da delillerin ağırlığı yaklaşımında sıralı test stratejisinin bir bölümü olarak tavsiye edillir. Tahriş edicilik için önerilmiş in vitro yeniden yapılandırılmış insan epidermisi model testi yasal düzenlemeler yapmak amacıyla kullanılmadan önce, bu test yönteminde açıklanan performans standartlarına uygun olarak geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1 ile mukayese edilebilirliğin sağlanması amacıyla önerilen kullanımının güvenilirliği, ilgisi (doğruluğu) ve kısıtlamaları belirlenmelidir (Ek).

Diğer iki in vitro yeniden yapılandırılmış insan epidermis test yöntemlerinin, bu test yöntemi bünyesindeki gereksinimlere uygun olarak geçerliliği kabul edilmiştir ve geçerliliği kabul edilmiş olan referans yöntem 1'dekine benzer sonuçlar verir(18). Bunlar değiştirilmiş EpiDerm™ test yöntemi (değiştirilmiş referans yöntem 2) ve SkinEthic RHE™ test yöntemidir (me-too yöntem 1).

1.2. Tanımlar

Aşağıdaki tanımlar bu test yönteminde kullanılır:

Doğruluk: Test yöntemi sonuçları ve kabul edilen referans değerleri arasındaki uyuşmanın yakınlığıdır. Test yöntem performansının bir ölçütüdür ve ilgili olduğunun göstergesidir. Bu terim, test yönteminin doğru sonuç dağılımını ifade etmek amacıyla uyum içerisinde değiştirilebilir bir biçimde kullanılır.

Seri kontrol maddesi: Dokunun orta seviyeli hücre canlılığına tepkisine neden olan değerlendirme maddesi.

Hücre canlılığı: Hücre popülasyonunun toplam aktivitesini ölçen parametre, örn. ölçülmüş sonlanma noktasına ve kullanılmış test tasarımına dayanan yaşayan hücrelerin toplam sayısı ve/veya canlılığı ile ilişkili canlı boya MTT'yi (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür, Tiyazol mavi;) azaltmak için hücresel mitokondriyal dehidrojenazlar.

ET50: Belirli, sabit derişimde (bkz. IC50) bir işaretleyici madde uygulanması sonucu hücre canlılığını % 50 oranda azaltmak için gereken maruz kalma süresi.

Yanlış negatiflik oranı: Test yöntemi ile yanlışlıkla negatif olarak tanımlanmış bütün pozitif maddelerin oranı. Test yöntemi performasının bir belirtecidir.

Yanlış pozitiflik oranı: Yanlışlıkla pozitif olarak tanımlanmış olan bütün negatif (aktif olmayan) maddelerin oranı. Test yöntemi performasının bir belirtecidir.

Sınırsız doz: Tamamen ve eşit oranda cilt yüzeyini kaplaması için gereken miktarı geçen, cilde uygulanmış olan test maddesi miktarı.

GHS (Birleşmiş Milletler'in sınıflandırma ve etiketlemeye ilişkin Küresel Uyumlaştırılmış Sistemi): Fiziksel, sağlığa ve çevreye ilişkin zararların standartlaştırılmış çeşitlerine ve seviyelerine göre, maddelerin ve karışımların sınıflandırmasını sağlayan ve zararlılık işaretleri, uyarı kelimeleri, zararlılık ifadeleri, önlem ifadeleri ve güvenlik bilgi formları gibi iletişim araçları ile insan sağlığını (çalışanları, işçileri, taşıyıcıları, tüketicileri ve acil durumda müdahale edenleri içerir) ve çevreyi (1) bunların yan etkilerinden korumaya yönelik bilgileri içeren, Maddelerin ve Karışımların Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Ambalajlanması Hakkında Yönetmelik ile uygulanan sistemdir.

IC50: Belirli maruz kalma süresinden sonra doku canlılığının % 50 (IC50) oranda azaldığı işaretleyici madde derişimidir, bkz. ET50.

Performans standartları: Mekanik ve fonksiyonel olarak benzer olan önerilmiş bir test yönteminin mukayese edilebilirliğinin değerlendirilmesi için geçerliliği kabul edilmiş referans yönteme dayalı standartlardır. (I)Zaruri test yöntemi bileşenlerini; (II) geçerliliği kabul edilmiş referans yöntemin kabul edilebilir performansını kanıtlamak için kullanılan maddeler arasından seçilen referans maddelerin azami listesini ve (III) geçerliliği kabul görmüş referans yöntemler için elde edilmiş olana dayalı doğruluk ile güvenilirliğin karşılaştırılabilir seviyesini içerir. Burada geçerli referans yöntemden elde edilenlere göre referans maddelerin azami listesi kullanılarak bir değerlendirme yapıldığında önerilen test yöntemi belirtilmelidir.

Güvenilirlik: Aynı protokolü kullanarak uygulandığında, zaman içerisinde laboratuvarlar içinde ve arasında yeniden üretilebilir şekilde uygulanabilen test yönteminin ölçüm kapsamı. Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası yeniden üretilebilirlik hesaplanarak değerlendirilir.

Duyarlılık: Test ile doğru bir şekilde sınıflandırılmış bütün pozitif/aktif maddelerin oranı. Kategorik sonuçlar üreten bir test yöntemi için doğruluk ölçümüdür ve test yönteminin uygunluk değerlendirmesinde önemli bir etkendir.

Özgüllük: Test ile doğru bir şekilde sınıflandırılmış bütün negatif/inaktif maddelerin oranı. Kategorik sonuçlar üreten bir test yöntemi için doğruluk ölçümüdür ve test yönteminin uygunluk değerlendirmesinde önemli bir etkendir.

Cilt tahrişi: Bir test maddesinin 4 saate kadar uygulanmasıyla ortaya çıkan geri dönüşümü olan cilt zararıdır. Cilt tahrişi, uyarımdan sonra kısa süreliğine görülen lokal olarak yükselen, immunojen olmayan tepkimedir (24). İnflamatuar reaksiyonları ve inflamatuar reaksiyon ile tahrişin (cilt kızarıklığı, ödem, kaşınma ve ağrı) klinik bulgularının çoğunu kapsayan geri dönüştürülebilir süreç bunun temel özelliğidir.

1.3. Amaç ve Sınırlandırmalar

Bu test yöntemi kapsamındaki yeniden yapılandırılmış insan epidermi testleri maddelerin sadece BM GHS Kategori 2'ye göre cilt tahriş edici olarak sınıflandırmasını içerir. Bu testler BM GHS'de tanımlandığı üzere maddelerin isteğe bağlı kategori 3'de sınıflandırılmasına izin vermediği için, artan tüm maddeler sınıflandırılmamalıdır (kategori yok). Yasal düzenlemeler yapma ihtiyacına bağlı olarak ve yeni sonlanma noktalarının eklenme olasılığına bağlı olarak, yeni me-too testin ilerlemesi ve gelişimini, bu test yöntemi revize edilebilir.

Bu test yöntemi, tahriş edici tek-bileşenli maddelerin (19) zararlarının tanımlanmasına olanak sağlar, ancak cilt aşındırıcılığına ilişkin yeterli bilgi vermez. Karışımlar, geçerlilik çalışmasında henüz değerlendirilmediğinden gazlar ve aerosoller test edilemez.

1.4. Testin İlkesi

Test maddesi; çok katmanlı, yüksek derecede farklılaşmış insan epidermi modeli biçimlendirmek için normal, insan kaynaklı epidermal keratinositlerden oluşan üç boyutlu yeniden yapılandırılmış insan epidermi modeline bölgesel olarak uygulanır. Bu, düzenli bazal, dikenli ve granüler katmanlar ve in vivo'da bulunana benzeyen modellerde düzenlenmiş hücresel lamellar lipid katmanlar içeren çok katmanlanmış korundan (stratum corneumdan) meydana gelmektedir.

Yeniden yapılandırılmış insan epidermi model testinin ilkesi, sitosidal tahriş edici maddelerin difüzyon ile koruna (stratum corneuma) nüfuz edebilmesi ve alttaki katman içindeki hücrelere sitotoksik olması temeline dayanır. Hücre canlılığı, canlı boya MTT'nin [3-(4,5- Dimetiltiazol -2-il)-2,5- difenil tetrazolium bromür, Tiyazol mavi; EINECS numarası 206-069-5, CAS numarası 298-93-1)], dokulardan özütlenmesinden sonra nicel olarak ölçülen mavi formazan tuzlara dehidrojenaz çevrilmesiyle ölçülür (20). Tahriş edici maddeler, tanımlanmış olan eşik düzeyi (örn. BM GHS Kategori 2 Tahriş Edici için $\leq$ % 50) altında hücre canlılığını azaltabilme yeterlilikleriyle tanımlanırlar. Tanımlanmış olan eşik düzeyi altında hücre canlılığını üreten maddeler sınıflandırılmayacaktır (örn. > % 50, kategori yok).

Yeniden yapılandırılmış insan epidermi model sistemleri, test katılarına, sıvılarına, yarı katı ve mumlarına uygulanabilir. Sıvılar, sulu ya da susuz, su içerisinde çözünür ya da çözünmez olabilirler. Mümkün ise katılar ince bir toz halinde test edilmelidirler. Geniş bir kimyasal sınıf yelpazesini temsil eden dikkatlice seçilmiş 58 madde, yeniden yapılandırılmış insan epidermi model test sistemlerinin geçerliliğinde yer almıştır, test yöntemlerinin genellikle kimyasal sınıflar üzerinden uygulanabilir olması beklenir (16). Geçerli kılma, 13 GHS Kateori 2 Tahriş Edici'yi içerir. Aşındırıcı olmayan asitler, bazlar, tuzlar ve diğer inorganik maddelerin geçerlilik kapsamında olmadığını ve hidroperoksitler, fenoller ve yüzey aktif maddeler gibi bilinen bazı organik tahriş edici sınıfların içerilmediği ya da sınırlı oranda içerildiği dikkate alınmalıdır.

1.5. Yeterlilik Gösterimi

Bu test yöntemine bağlı olan geçerliliği kabul edilmiş bir yöntemin rutin kullanımından önce, laboratuvarlar, Tablo 1'de tavsiye edilen 10 test maddesini kullanarak, teknik yeterliliği göstermeyi isteyebilirler. Bu test yöntemi kapsamında, BM GHS isteğe bağlı kategori 3 "kategorisiz" olarak nitelendirilir. Geçerliliği kabul edilmiş olan referans yöntemlere yapısal ve fonksiyonel olarak benzeyen bu test yöntemi kapsamında geliştirilmiş yeni benzer (me-too) test yöntemleri için ya da geçerliliği kabul edilmiş yöntemlerin değişiklikleri için bu test yönteminin ekinde tanımlanmış olan performans standartları, yasal düzenlemeler amacıyla test yapmak için kullanımından önce yeni test yönteminin karşılaştırılabilir güvenilirliğinin ve doğruluğunun gösterimi için kullanılmalıdır.

Tablo 1
Ek içerisinde listelenmiş olan referans maddelerin alt kümesi olan yeterlilik maddeleri

Madde	CAS	*İn vivo* puanı	Fiziksel	GHS kategorisi
Naftalin asetik asit	86-87-3	0	S	Kategori Yok
İzopropanol	67-63-0	0,3	L	Kategori Yok
Metil stearat	112-61-8	1	S	Kategori Yok
Heptil butirat	5870-93-9	1,7	L	İsteğe bağlı
Hekzil salisilat	6259-76-3	2	L	İsteğe bağlı
Siklamen aldehit	103-95-7	2,3	L	Kategori 2
1- bromohekzan	111-25-1	2,7	L	Kategori 2
Bütil metakrilat	97-88-1	3	L	Kategori 2
1-metil -3 fenil-	5271-27-2	3,3	S	Kategori 2
Heptanal	111-71-7	4	L	Kategori 2

1.6. Yöntemin Tanımı

Cilt tahrişi değerlendirmesi için yeniden yapılandırılmış insan epidermi model testinin usulleri ve bileşenlerinin tanımı aşağıda verilmiştir. Yeniden yapılandırılmış insan epidermi modeli yapılandırılabilir, hazırlanabilir ya da ticari olarak (örn. EpiSkin™, EpiDerm™ ve SkinEthic RHE™) elde edilebilir. EpiSkin™, EpiDerm™ ve SkinEthic RHE™ için standart test yöntemi protokolleri, [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu] internet adresinden elde edilebilir (21, 22, 23). Test aşağıdakilere göre yürütülür:

1.6.1. Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermi Modeli Bileşenleri

1.6.1.1. Genel model koşulları

Normal insan keratinosidleri, epitelyum yapılandırması için kullanılabilir. Canlı epitelyal hücrelerin çoklu katmanları (bazal katman, stratum spinosum, stratum granulosum), fonksiyonel korun (stratum corneum) altında gösterilmelidir. Korun (stratum corneum), sitosidal işaretleyici maddenin hızlı nüfuz direncine karşı bir fonksiyonel bariyer üretmek için temel yağ kesiti içeren çok katmanlı bir yapıya sahip olmalıdır, örn. sodyum dodesil sülfat (SDS) ya da Triton X-100. Bariyer fonksiyon, belirli maruz kalma süresinden sonra dokuların hücre canlılığını %50 (IC50) oranda azaltan işaretleyici madde derişiminin belirlenmesiyle veya belirli ve sabit bir derişimdeki işaretleyici maddenin hücre canlılığını %50 (ET50) oranda azalttığı maruz kalma süresinin tayiniyle değerlendirilebilir. Modelin içerik özellikleri, korun (stratum corneum) etrafındaki materyalin canlı dokuya geçişine engel olmalıdır çünkü bu durum cilt maruz kalmasına ilişkin yetersiz modellemeye yol açar. Cilt modeli, bakteriler, virüsler, mikoplazma ya da mantar ile kirlenmemiş olmalıdır.

1.6.1.2. Fonksiyonel model koşulları

1.6.1.2.1. Canlılık

Canlılık boyutunun belirlenmesi için tercih edilen analiz MTT dir (20). Negatif kontrol (NC) ile muamele edilmiş olan dokudan özütlenmiş (çözünmüş) boyanın optik yoğunluğu (OD), özütleme çözeltisinin kendi optik yoğunluğundan en az 20 kat daha büyüklük olmalıdır. NC ile muamele edilmiş olan dokunun, test maruz kalma süreci boyunca kültürde (benzer canlılık ölçümlerinde) kararlı olduğu belgelendirilmelidir.

1.6.1.2.2. Bariyer fonksiyon

Korun (stratum corneum) ve buna ait yağ bileşimi, sitotoksik işaretleyici maddelerin hızlı nüfuzuna karşı direnç gösterebilmelidir.Örneğin IC50 veya ET50 ile tahmin edilen SDS ya da Triton X-100.

1.6.1.2.3. Morfoloji

Yeniden yapılandırılmış cildin/epidermisin histolojik analizi, uygun nitelikli personel ile gerçekleştirilmelidir. Bu personel yapıyı, insan cildi/epidermisi benzeri (çok katmanlı hale getirilmiş korun (stratum corneum) içeren) yapı olarak ayırt edebilmelidir.

1.6.1.2.4. Tekrarlanabilirlik

Belirli bir model kullanan yöntemin sonuçları, tercihen uygun seri kontrol (değerlendirme) maddesi ile zaman içerisinde tekrarlanabilirliği göstermelidir (bkz. Ek).

1.6.1.2.5. Modelin Kalite Kontrolleri (QC)

Kullanılan her epidermal modelin serisi, üretim salım kriterini karşılamalıdır ki bunlardan en ilgiliolanları canlılık (paragraf 1.6.1.2.1) ve bariyer fonksiyon (paragraf 1.6.1.2.2) için olanlardır. IC50 ya da ET50 için kabul edilebilir aralık (üst limit ve alt limit), cilt model tedarikçisiyle (ya da kurum içi model kullanırken bir araştırmacı ile) geliştirilmelidir.

Dokuların bariyer özellikleri, dokuların alınmasından sonra laboratuvar tarafından doğrulanmalıdır. Sadece nitelikli dokular ile üretilmiş olan sonuçlar tahriş etkilerinin güvenilir tahmini için kabul edilebilir. Örnek olarak geçerliliği kabul edilmiş yöntemler için kabul edilebilir aralık aşağıda verilmektedir.

Tablo 2
Kalite Kontrol Seri Salım Kriteri Örnekleri

	Alt kabul sınırı	Kabul aralığı ortalaması	Üst kabul sınırı
Geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem1	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem2 (% 1 Triton X-100)	ET_{50} = 4,8 saat	ET_{50} = 6,7 saat	ET_{50} = 8,7 saat

1.6.1.3. Test ve Kontrol Maddelerinin Uygulanması

Her muamele ve kontrol için yeterli sayıda (en az üç) tekrar yapılmalıdır. Yeterli miktarda test maddesi,katı maddeler gibi sıvı maddeler için de, sonsuz dozdan kaçınmakla beraber cilt yüzeyini eşit düzeyde kaplamak için uygulanmalıdır, örneğin minimum 25 µL/cm2 ya da 25 mg/cm2 kullanılmalıdır. Katı maddeler için, uygulamadan önce cilt yüzeyi ile iyi temas etmesini sağlamak amacıyla epidermis yüzeyi deiyonize veya damıtılmış su ile nemlendirilmelidir. Mümkün olduğunda katılar ince bir toz halinde test edilmelidir. Maruz kalma sürecinin bitiminde, sulu tampon ya da % 0,9 NaCl ile test maddesi cilt yüzeyinden dikkatli bir şekilde yıkanmalıdır. Kullanılan yeniden yapılandırılmış insan epidermi modeline bağlı olarak, maruz kalma süresi 15 ila 60 dakika arasında ve 20 ila 37 °C arasındaki inkübasyon sıcaklığında değişiklik gösterebilir. Detaylar için, üç yönteme (21, 22, 23) ilişkin olan "Standard Uygulama Usulleri"ne bakınız.

Dokuların canlılık (NC), bariyer fonksiyon ve nihai doku hassasiyetlerinin (PC)geçmişte belirlenen kabul edilebilirlik aralığının içerisinde olduğunugöstermek amacıyla her çalışmada eş zamanlı NC ve pozitif kontroller (PC) kullanılmalıdır. Tavsiye edilen PC madde % 5'lik sulu SDS'dir. Tavsiye edilen NC maddeler, su ya da fosfat ile tamponlanmış tuzlardır (PBS).

1.6.1.4. Hücre Canlılığı Ölçümleri

Test prosedürünün en önemli elementi, canlılık ölçümlerinin test maddelerine maruz kalmanın hemen ardından yapılmayıp, temiz ortam içerisinde durulanmış dokuların yeterli sürede muamele sonrası inkübasyon periyodundan sonra yapılıyor olmasıdır. Bu periyot, hem zayıf tahriş edici etkilerden kurtulmaya hem de temiz sitosidal etkilerin ortaya çıkmasına izin verir. Test optimizasyon fazı esnasında (9, 10, 11, 12, 13), 42 saat muamele sonrası inkübasyon periyodunun optimal olduğu kanıtlanmış ve bu nedenle referans test yöntemlerinin geçerliliğinde kullanılmıştır.

MIT çevrim deneyi, hücre canlılığını ölçmek için kullanılması gereken ve nicel olarakgeçerliliği kabul edilmiş bir yöntemdir. Bu yöntem, üç boyutlu doku yapılandırılmasında kullanım ile uyumludur. Cilt numunesi, uygun derişimdeki (örn. 0,3-1 mg/mL) MIT çözeltisine 3 saatliğine yerleştirilir. Çöktürülmüş mavi formazan ürün, bir

çözücü ile (örn. isopropanol, asidik isopropanol) dokudan uzaklaştırılır ve formazan derişimi maksimum ± 30 nm'lik bant geçirici kullanarak 570 nm'de OD tayiniyle ölçülür.

Test maddesinin optik özellikleri ya da MTT üzerine kimyasal etkisi, canlılığın yanlış tahminine neden olan deney ile çatışabilir (çünkü test maddesi, renk jenerasyonuna neden olmasının yanı sıra buna engel olabilir ya da tersine de çevirebilir). Bu, test maddesi durulama ile ciltten tamamen çıkarılmadığında ya da epidermisin içine nüfuz ettiğinde meydana gelir.

Eğer test maddesi MTT üzerine doğrudan etki eder, doku muamelesi esnasında doğal olarak boyanır ya da boyanmış hale getirilir ise, test maddesi etkileşiminin tespiti ya da doğrulanması amacıyla,canlılık ölçüm tekniği kullanılarak ek kontroller yapılmalıdır. MTT indirgenmesinin doğrudan nasıl yapılacağının detaylı olarak açıklandığı geçerliliği kabul edilmiş referans yöntemler (21, 22, 23) için test yöntemi protokollerine başvurun. Bu etkileşimlerden dolayı özel olmayan renk (NSC), NC'nin % 30'unu geçmemelidir (düzeltmeler için). Eğer NSC %30'dan büyük ise test maddesinin test ile uyumsuz olduğu kabul edilir.

1.6.1.5. Deney Kabul Edilebilirlik Kriteri

Geçerliliği kabul edilmiş seriler (bakınız paragraf 1.6.1.2.5) kullanan her deney için NC ile muamele edilmiş dokular, taşınması ve kabul adımları ve tahriş protokollerini takip eden dokuların kalitesini yansıtan optik yoğunluk (OD) ortaya koymalıdır. Kontrollerin OD değerleri, önceden belirlenmiş olan alt sınırların altında olmamalıdır. Benzer olarak, PC ile muamele edilmiş olan dokular, örneğin % 5'lik sulu SDS, her bir deneyin kendi koşulları için, dokulardaki hassasiyeti ve tahriş edici bir maddeye olan müdahaleyi yansıtmalıdır (örneğin geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1 için canlılık ≤ %40 ve geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 2 için canlılık ≤ %20). Doku tekrarları arasında değişebilirliğin ilgili ve uygun ölçümleri açıklanmalıdır (örneğin eğer standart sapmalar kullanılır ise bunlar ≤ %18 olmalıdır).

2. VERİ

2.1. Veri

Her muamele için, ayrı tekrar test numunelerinden elde edilen veri (örneğin her test maddesi için sınıflandırmayı da içeren OD değerleri ve hesaplanmış hücre canlılık verisi oranı), uygun hallerde tekrar edilen deneylerin verilerini içeren çizelge halinde rapor edilmelidir. Her deneme için ortalama ± standart sapma ek olarak rapor edilmelidir. MTT belirteci ile gözlenen etkileşimler ve renklendirilmiş test maddeleri, her test maddesi için rapor edilmelidir.

2.2. Sonuçların Yorumlanması

Her test numunesi ile elde edilen OD değerleri, % 100'e ayarlanmış olan NC'ye göre canlılık oranını hesaplamak için kullanılabilir. Tahriş edici maddeleri sınıflandırılmamış test maddelerinden ayırt etmeye yarayan hücre canlılık oranının sınır değeri ve sonuçları değerlendirmek ve tahriş edici maddeleri tespit etmek için kullanılan istatistiki usuller açık bir şekilde tanımlanmalı, belgelendirilmeli ve uygun olduğu kanıtlanmalıdır. Geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem ile ilgili tahriş tahmini için sınır değerler aşağıda verilmektedir:

Test maddesi,

(i) Eğer maruz kalma ve tedavi sonrası inkübasyondan sonra doku canlılığı, % 50'den daha az ya da eşit ise (≤)

BM GHS Kategori 2 gereğince, cilt için tahriş edici olarak nitelendirilir.

(ii) Eğer maruz kalma ve tedavi sonrası inkübasyondan sonra doku canlılığı, % 50'den daha fazla ise (>)

kategorisiz olarak nitelendirilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test Raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test ve kontrol maddeleri:

- IUPAC ya da CAS adı gibi kimyasal isim(ler) ve eğer biliniyor ise CAS numarası
- maddenin saflığı ve kompozisyonu (ağırlıkça yüzde olarak),
- çalışmanın yürütülmesi ile ilgili fiziksel – kimyasal özellikler (örn. fiziksel durum, kararlılık ve uçuculuk, pH, eğer biliniyor ise sudaki çözünürlük),
- eğer uygulanabilir ise test etmeden önce test/kontrol maddelerinin davranışı (örn. ısıtma, aşındırma),
- depolama koşulları.

Kullanılan cilt modelinin ve usulün gerekçelendirilmesi.

Test koşulları:

- kullanılan hücre sistemi,
- ölçüm gereçleri için kalibrasyon bilgisi ve hücre canlılığının ölçümü için kullanılan bant geçişi (spektrofotometre),
- kullanılan belirli cilt modeli için performansı da içeren eksiksiz destekleyici bilgi.
- Bunlar aşağıdakileri içermeli ancak bunlarla sınırlı kalmamalıdır:
  (i)canlılık;
  (ii) bariyer fonksiyon;
  (iii) morfoloji;
  (iv) tekrarlanabilirlik ve belirleyicilik;
  (v) modelin kalite kontrolleri (QC);
- kullanılan test usullerinin detayları
- kullanılan test yöntemleri, maruz kalma süresi ve muamele sonrası inkübasyon süreci,
- test usulunün herhangi bir değişikliğine ilişkin tanımlama,
- modelin geçmiş verilerine ilişkin referans.

Bunlar aşağıdakileri içermeli ancak bunlarla sınırlı kalmamalıdır:

(i)geçmiş seri verilerine ilişkin kalite kontrolünün kabul edilebilirliği,
(ii)negatif ve pozitif kontrol ortalamaları ve aralıklarına ilişkin pozitif ve negatif kontrol değerlerinin kabul edilebilirliği,

- tahmin modeli için sınır noktaların seçiminde gerekçeleri de içeren kullanılmış değerlendirme kriterinin tanımlanması.

Sonuçlar:

- ayrı test numunelerinden elde edilen verinin tabloya aktarılması,
- elde edilen diğer etkilerin tanımlanması.

Sonuçların tartışılması.

Sonuç.

4. KAYNAKLAR

(1) United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.

(2) REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Available at: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en. htm?time=1232447649.

(3) Test Yöntemi B.4. Akut Toksisite: Deri Tahrişi /Aşınma.

(4) Test yöntemi B.40. Ciltte Aşınma

(5) Test Method B.40 BIS. IN VITRO SKIN CORROSION: HUMAN SKIN MODEL TEST.

(6) OECD (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. In Vitro Membrane Barrier Test Method. Adopted July 19, 2006. Available at: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.

(7) ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(8) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes,

(9) P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 15, 57-93.

(10) Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicology in Vitro 16, 765-770.

(11) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Opti- misation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests. ALTEX 21, 107-114.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The Epi- Derm Test Protocol fort the Upcoming ECVAM Validation Study on In Vitro Skin Irritation Tests — An Assessment of the Performance of the Optimised Test. ATLA 33, 351-367.

(13) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The In Vitro Acute Skin Irri- tation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. ATLA 33, 329-249.

(14) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Hey- lings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM

prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irrita- tion Task Force Report 2. ATLA 30,109-129.

(15) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotović, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integ- rity Function Test. ATLA 35, 559-601.

(16) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α. 135 pp. + annexes. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(17) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang. V (2007) ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35,603-619.

(18) J. Cotovio, M.-H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonneaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy — Results and perfor- mances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, 351-358.

(19) ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays. 5 November 2008.

(20) EC (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union L 396 of 30 December 2006, p. 1. OPOCE, Luxembourg.

(21) Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

(22) EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test — 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(23) EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. In Vitro Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Available under Download Study Documents, at: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(24) SkinEthic RHE™ SOP. Will be available under Download Study Documents, at:

(25) http://ecvam.jrc.ec.europa.eu.

(26) Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. Practical Contact Dermatitis Mc Graw-Hill New York, pp 7-18

(27) Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for in vitro skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, November 13, 2008.

Ek-I

Cilt tahrişi için in vitro yeniden yapılandırılmış insan epidermi modelleri öneren performans özelliklerinin değerlendirilmesi

Giriş

Bu test yönteminde kullanım için önerilen prosedürler, güvenilirlik ve doğruluğu temin için, Draize tahriş skorlarının tam aralığını temsil eden maddeler kullanılarak değerlendirilmelidir. Tavsiye edilmiş 20 referans madde kullanılarak değerlendirme yapıldığında (Tablo 2), önerilen prosedür, geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1 ile karşılaştırılabilir olmalıdır (Tablo 3) (1). Erişilmesi gereken doğruluk ve güvenilirlik standartları, aşağıda II ve III altında yer almaktadır. Önerilen test yönteminin güvenilirliğinin ve performansının (hassasiyet, özgünlük, yanlış negatif oranlar ve yanlış pozitif oranlar ve doğruluk) geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1 ile karşılaştırılabilmesi için, ilgili kimyasal sınıfları temsil eden sınıflandırılmamış ve sınıflandırılmış (BM GHS kategori 2) maddelerdahil edilmiştir. Test yönteminin güvenilirliği ve BM GHS kategori 2 tahriş edici maddeleri doğru bir şekilde tanımlayan yeterliliği yeni maddelerin test edilmesi için kullanılmadan önce değerlendirilmelidir.

Performans Standartları

Performans standartları şu üç öğeden oluşur; I) Gerekli Test Yöntemi Bileşenleri, II) Referans Maddeler ve III) Tanımlanmış Doğruluk ve Güvenilirlik Değerleri (2). Bu Performans Standartları, ECVAM cilt tahrişi geçerliliği çalışması tamamlandıktan sonra tanımlanan Performans Standartlarına dayanır (3).

(I)Gerekli Test Yöntemi Bileşenleri

Genel model koşulları

Normal insan keratinosidleri, epitelyumun yapılandırması için kullanılmalıdır. Canlı epitel hücrelerin çoklu katmanları (bazal katman, stratum spinosum, stratum granulosum), fonksiyonel korun (stratum corneum) altında gösterilmelidir. Korun (stratum corneum), sitosidal işaretleyici maddelerin (örn. sodyum dodesil sülfat (SDS) ya da Triton X-100) hızlı nüfuz etmesine direnç gösterecek sağlam bir fonksiyonel bariyer üretmek için gerekli yağ kesitini içerecek şekilde çok katmanlı hale getirilmelidir. Bariyer fonksiyonu, ya belirli bir maruz kalma süresindeki işaretleyici bir maddenin doku canlılığını %50 oranda düşürdüğü derişimin (IC50) tayiniyle ya da belirli ve sabit bir derişimde işaretleyici bir maddenin uygulanması ile hücre canlılığını %50 oranda düşürmek için gerekli maruz kalma süresinin (ET50) tayiniyle değerlendirilebilir.

Modelin sınırlama özellikleri, cilt maruz kalmasının kötü modellenmesine neden olan korun (stratum corneum) etrafındaki malzemenin canlı dokuya geçişine engel olmalıdır. Cilt modeli, bakteriler, virüsler, mikoplazma ya da mantar ile kirlenmemiş olmalıdır.

Fonksiyonel model koşulları

Canlılık
Canlılık boyutunun belirlenmesi için tercih edilen analiz MTT dir (4). Negatif kontrol (NC) ile muamele edilmiş olan dokudan özütlenmiş (çözünmüş) boyanın optik yoğunluğu,

özütleme çözeltisinin kendi optik yoğunluğundan en az 20 kat daha büyüklük olmalıdır. NC ile muamele edilmiş olan dokunun, test maruz kalma süresince kültürde (benzer canlılık ölçümlerinde) kararlı olduğu belgelendirilmelidir.

Bariyer fonksiyon

Korun (stratum corneum) ve onun yağ bileşimi, sitotoksik işaretleyici maddelerin hızlı nüfuz etmesine direnç göstermeye elverişli olmalıdır(örn. IC50 veya ET50 ile tahmin edilen SDS ya da Triton X-100 gibi).

Morfoloji

Yeniden yapılandırılmış cildin/epidermisin histolojik analizi, uygun nitelikli personel ile gerçekleştirilmelidir. Bu personel yapıyı, insan cildi/epidermisi-benzeri (çok katmanlı hale getirilmiş stratum corneum içeren) yapı olarak ifade ayırt edebilenedebilmelidir., uygun nitelikli personel ile gerçekleştirilmelidir.

Tekrarlanabilirlik

Belirli bir model kullanan yöntemin sonuçları, tercihen uygun dizi kontrol (değerlendirme) maddesi ile, zaman içerisinde tekrarlanabilirliği göstermelidir.(bkz. Tanımlar, başlık 1.2).

Modelin Kalite Kontrolleri (QC)

Kullanılan her epidermal modelin dizisi, en önemlileri canlılık ve bariyer fonksiyonu olan belirli üretim salım kriterini karşılamalıdır. IC_{50} ya da ET_{50} için kabul edilebilir aralık (üst sınır ve alt sınır), cilt model tedarikçisiyle (ya da kurum içi model kullanırken bir tahkik görevlisi ile) geliştirilmelidir. Dokuların bariyer özellikleri, dokuların alınmasından sonra laboratuvar tarafından doğrulanmalıdır. Sadece nitelikli dokular ile üretilmiş olan sonuçlar tahriş etkilerinin güvenilir tahmini için kabul edilebilir. Örnek olarak geçerliliği kabul edilmiş yöntemler için kabul edilebilir aralık aşağıda verilmektedir.

Tablo 1
Kalite Kontrol Dizi Salım Kriteri Örnekleri

	Alt kabul sınırı	Kabul aralığı ortalaması	Üst kabul sınırı
Geçerliliği kabul edilmiş referans	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 2,32 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
Geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 2	ET_{50} = 4,8 saat	ET_{50} = 6,7 saat	ET_{50} = 8,7 saat

(II) Referans Maddeler

Heptil butirat	5870-93-9	227-526-5	L	1,7	Kategori Yok	İsteğe bağlı Kategori 3
Hekzil salisilat	6259-76-3	228-408-6	L	2	Kategori Yok	İsteğe bağlı Kategori 3
Tri-izobutil fosfat	126-71-6	204-798-3	L	2	Kategori 2	İsteğe bağlı Kategori 3
1-dekanol	112-30-1	203-956-9	L	2,3	Kategori 2	Kategori 2
Siklamen aldehid	103-95-7	203-161-7	L	2,3	Kategori 2	Kategori 2
1-bromohekzan	111-25-1	203-850-2	L	2,7	Kategori 2	Kategori 2
2-klorometil-3,5-dimetil -4-metoksipiridin hidroklorid	86604-75-3	434-680-9	S	2,7	Kategori 2	Kategori 2
a-terpineol	98-55-5	202-680-6	L	2,7	Kategori 2	Kategori 2
di-n-propildisülfid	629-19-6	211-079-8	L	3	Kategori Yok	Kategori 2
Bütil metakrilat	97-88-1	202-615-1	L	3	Kategori 2	Kategori 2
Benzenetiyol, 5-(1,1-dimetiletil)-2-metil	7340-90-1	438-520-9	L	3,3	Kategori 2	Kategori 2
1-metil – 3-fenil – 1-piperazin	5271-27-2	431-180-2	S	3,3	Kategori 2	Kategori 2
Heptanal	111-71-7	203-898-4	L	4	Kategori 2	Kategori 2

Referans maddeler, in vitro yeniden yapılandırılmış, yapısal ve işlevsel olarak geçerli referans yöntemlerle yeterince benzerlik gösteren veya geçerli referans yöntemin küçük bir modifikasyonunu temsil eden, yeni insan epidermi taslak test yönteminin güvenilirliğinin ve doğruluğunun geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1 ile kıyaslanabilir olduğunu göstermek için kullanılır. Tablo 2'de listelenen 20 referans madde, BM GHS Kategori 2'de yer alan ve farklı kimyasal sınıflarda olan

maddelerden oluşmaktadır. Bu listede, 10 adet BM GHS Kategori 2'de yer alan madde, 3 adet BM GHS isteğe bağlı Kategori 3'de yer alan madde ve 7 adet kategorisi olmayan madde yer almaktadır. Bu test yönteminde isteğe bağlı kategori 3, kategorisi olmayan olarak kabul edilir. Bu referans maddeler, cilt tahrişi için önerilen yeniden yapılandırılmış insan epidermi test yönteminin doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek için kullanılması gereken maddelerin yeter sayısını temsil eder. Listelenmiş maddelerin mevcut olmadığı durumlarda, uygun in vivo referans verisi olan diğer maddeler kullanılabilir. Eğer istenir ise, diğer kimyasal sınıfları temsil eden ve uygun in vivo referans verisi olan ek maddeler, bundan başka önerilen test yönteminin doğruluğunu daha fazla değerlendirmek için referans maddelerin minimum listesineeklenebilir.

Tablo 2

Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermi Cilt Tahrişi Modellerinde Doğruluk ve Güvenilirlik Değerlerinin Tayini için Referans Maddeler

Madde (*)	CAS No	EINECS No	Fiziksel Hal	*İn vivo puanı*	GHS *in vitro* kategori	GHS *in vivo* kategori
1-bromo-4-klorobütan	6940-78-9	230-089-3	L	0	Kategori 2	Kategori Yok
Dietil ftalat	84-66-2	201-550-6	L	0	Kategori Yok	Kategori Yok
Naftalin asetik asit	86-87-3	201-705-8	S	0	Kategori Yok	Kategori Yok
Alil fenoksi asetat	7493-74-5	231-335-2	L	0,3	Kategori Yok	Kategori Yok
Isopropanol	67-63-0	200-661-7	L	0,3	Kategori Yok	Kategori Yok
4-metil-tiyo-benzaldehit	3446-89-7	222-365-7	L	1	Kategori 2	Kategori Yok
Metil stearat	112-61-8	203-990-4	S	1	Kategori Yok	Kategori Yok

(*) 20 referans madde, aslında geçeliliği kabul edilmiş referans yöntem 1'e uygulanan 58 maddenin temsili seçimini ihtiva eder (EpiSkin™). Test maddelerinin tam listesi ve seçim kriteri mevcuttur (5).

Tablo 2' de listelenen maddeler, ECVAM uluslararası cilt tahriş geçerlilik çalışmasında kullanılan 58 maddenin temsili dağılımını gösterir (1).

Bunların seçimi aşağıdaki kriterlere dayanır:
— maddelerin ticari olarak ulaşılabilir olması,
— Draize tahriş edici puanı tam aralığının temsilcisi olmaları (tahriş edici olmayandan olana kadar),
— iyi tanımlanmış kimyasal yapılarının olması,
— ECVAM geçerlilik çalışmasında belirlendiği üzere geçerliliği kabul edilmiş yöntemin tekrarlanabilirliğinin ve tahmini kapasitesinin temsilcisi olmaları,

— geçerlilik sürecinde kullanılan kimyasal fonksiyonelliğinin temsilcisi olmaları,
— aşırı toksik profil(örn. üreme sistemine toksik ve kanserojen) ile ilişkili olmamaları ve yüksek maliyetli olmamaları.

(III) Tanımlanmış Doğruluk ve Güvenilirlik Değerleri

Önerilen test yönteminin performansı (hassasiyet, özgünlük, yanlış negatif oran, yanlış pozitif oran ve doğruluk), geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1'e (Tablo 3) karşılaştırılabilir olmalıdır, örneğin hassasiyet %80'e eşit ya da daha büyük olmalıdır, özgünlük %70'e eşit ya da daha büyük olmalıdır ve doğruluk %75'e eşit ya da daha büyük olmalıdır. Performans hesaplaması, farklı katılımcı laboratuvarlarda 20 madde için elde edilmiş olan bütün sınıflandırmaları kullanarak yapılmalıdır. Her laboratuvarda her madde için sınıflandırma, gerçekleştirilen farklı tekrarlar (minimum 3 geçerli tekrar) boyunca canlılığın ortalama değeri kullanılarak elde edilmelidir.

Tablo 3
Geçerliliği Kabul Edilmiş Yöntem 1'in Performansı[1]

Test Yöntemi	Madde No	Hassasiyet	Özgünlük	Yanlış negatif oran	Yanlış pozitif oran	Doğruluk
Geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1 (1)	58	%87,2 (2)	% 71,1 (3)	%12,8	%29,9	%74,7
Geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem 1 (1)	20	%90	%73,3	%10	%26,7	%81,7

(1) EpiSkin™
(2) 13 GHS kategori 2 tahriş edicilere göre
(3) 45 GHS kategori 3 tahriş edicilere ya da GHS kategorisi olmayan kimyasallara göreÖnerilen test yönteminin güvenilirliği, geçerliliği kabul edilmiş olan referans yöntemlere kıyaslanabilir olmalıdır.

Laboratuvar içerisinde tekrarlanabilirlik

Laboratuvar içerisinde değişkenliğin değerlendirmesi, bir tek laboratuvar içerisinde 20 referans maddenin farklı, bağımsız testlerdekisınıflandırma uyumu (kategori 2/kategori yok) %90'a eşit ya da daha fazlaolmalıdır.

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik

[1] Tablo 3, sırasıyla 58 ve 20 referans maddeler (Tablo 2) için, tahriş edici maddeleri (BM GHS kategori 2) ve sınıflandırılmamış maddeleri (isteğe bağlı kategori 3'ü dahil kategorisi olmayan) doğru tanımlama yeterliliğine dayanarak geçerliliği kabul edilmiş referans yöntem1'in performansını verir.

Eğer önerilen test yöntemi sadece bir laboratuvarda kullanılacak ise laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğin değerlendirmesi gerekli değildir. Laboratuvarlar arasında transfer edilecek olan yöntemler için tercihen minimum üç laboratuvar arasında 20 referans maddenin farklı, bağımsız testlerdeki sınıflandırmaların uyumu (kategori 2/kategori yok), %80'e eşit ya da daha fazla olmalıdır.

Kaynaklar

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

B.47. OKÜLER AŞINDIRICILAR VE CİDDİ TAHRİŞ EDİCİLERİ TEŞHİS İÇİN SIĞIR KORNEASI OPAKLIĞI VE GEÇİRGENLİĞİ TEST YÖNTEMİ

GİRİŞ

1. Sığır korneası opaklığı ve geçirgenliği (BCOP) test yöntemi, maddeleri ve karışımları bazı koşullarda ve belli sınırlamalarla "oküler aşındırıcı ve ciddi tahriş edici" olarak tanımlamak için kullanılabilen *in vitro*bir test yöntemidir (1) (2) (3). Bu test yöntemi açısından ciddi tahriş ediciler, tavşanlara tatbik edildikten sonra en az 21 gün boyunca oküler yaralara yol açan tahriş edicilerdir. BCOP *in vivo*tavşan gözü testine tam bir alternatif olmasa da belli bir uygulama alanında düzenleyici sınıflandırma ve etiketleme için aşamalı test stratejisinin parçası olarak önerilmektedir (4) (5). Test edilen maddeler ve karışımlar (6) tavşanlarda ayrıca test yapmaya gerek kalmadan oküler aşındırıcı veya ciddi tahriş edici olarak kategorize edilebilirler. Test sonucu negatif çıkan maddenin, OECD Test Yönergesi 405 (7) (BuEk'in B. 5 kısmı) gereğince ardışık test stratejisi kullanılarak tavşanlar üzerinde test edilmesine gerek kalmamaktadır.

2. Bu test yönteminin amacı, test maddesinin oküler aşındırıcılık veya ciddi tahriş edicilik potansiyelini izole sığır korneası üzerinde opaklığa ve artan geçirgenliğe yol açma düzeyi ölçülmek suretiyle değerlendirecek usulleri belirlemektir. Kornea üzerinde toksik etkiler (i) azalan ışık iletkenliği (opaklık) ve (ii) artan sodyum floresin boya geçişi (geçirgenlik) ölçülerek tespit edilir. Korneanın test materyaline maruz bırakılmasından sonra yapılan kornea opaklık ve geçirgenlik ölçümleri birleştirilerek, test materyalinintahriş edicilik düzeyini sınıflandırmak için kullanılan *InVitro*Tahriş Edicilik Puanı (IVIS) elde edilir.

3. 21 günden daha az süreli yaralara yol açan oküler tahriş ediciler ve tahriş edici olmayan maddeler de BCOP test yöntemi kullanılarak test edilmektedir. Ancak, bu kategorilerdeki maddeler için BCOP test yönteminin kesinliği ve güvenilirliği resmi olarak değerlendirilmemiştir.

4. Tanımlar Ek-I'de yer almaktadır.

ÖNCELİKLİ HUSUSLAR VE SINIRLAR

5. Bu test yöntemi Avrupa Alternatif Yöntemler Değerlendirme Merkezi (ECVAM) ve Japonya Alternatif Yöntemler Değerlendirme Merkezi (JaCVAM) katkılarıyla hazırlanan uluslararası değerlendirme çalışması (4)(5)(9) sonucunda Alternatif Yöntemlerin Değerlendirilmesi Konusunda Kurumlararası Koordinasyon Komitesi (ICCVAM) tarafından oluşturulan BCOP test yöntemi protokolüne (8) dayanmaktadır. Protokol InVitro Bilimler Enstitüsü'nden (IIVS) edinilen bilgiler ile 1997-1998 döneminde Avrupa Topluluğu desteğinde gerçekleştirilen BCOP deneyinin ön değerlendirme çalışmasında kullanılan protokol mahiyetindeki INVITTOX Protokolü 124 (10) temelindedir. Her iki protokol de ilk defa Gautheronv.d. tarafından raporlanan BCOP deney protokolüne dayanmaktadır (11).

6. Bu test yönteminin tanımlanmış sınırları, değerlendirme veri tabanında alkoller ve ketonlarda yüksek düzeyde hatalı pozitif ve katı maddelerde yüksek düzeyde hatalı negatif oranlara dayanır (bkz. fıkra 44) (5). Bu kimyasal ve fiziksel vasıftaki maddeler veri tabanından çıkarıldığı zaman AB, EPA ve GHS sınıflandırma sistemleri üzerinden BCOP kesinliği ciddi ölçüde artmaktadır (5). Bu deneyin amacına bağlı olarak, hatalı

negatif oranlar kritik düzeyde sayılmaz. Çünkü, (örneğin sadece oküler aşındırıcıların/ciddi tahriş edicilerin teşhisi dikkate alındığında) maddeler daha sonra tavşanlar üzerinde veya düzenleyici koşullara göre doğrulanmış bir diğer in vitroyöntemle, ardışık test stratejisi ve kanıt ağırlığı yaklaşımıyla test edilir. Ayrıca, mevcut değerlendirme veri tabanı bazı kimyasal maddelerin ve karışımlar gibi bazı ürünlerin doğru şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamamaktadır. Bununla birlikte, araştırmacılar bu yöntemi kullanmayı oküler aşındırıcı veya ciddi tahriş edici tepkisi olarak pozitif sonuçlar beklenen hallerde her türden test maddesi (karışımlar dahil) için dikkate alabilirler. Yine de ciddi öngörü riski nedeniyle, alkoller ve ketonlar için elde edilen pozitif sonuçlar daha dikkatle yorumlanmalıdır.

7. Sığır gözleri ve sığır korneaları ile yapılacak tüm işlemler, hayvansal materyallerin işlemden geçirilmesi için testin yapıldığı tesiste geçerli olan düzenlemeler ve prosedürlere uygun olmalıdır. Hayvansal materyaller, sadece, dokular ve doku sıvıları ile sınırlı değildir. Genel laboratuvar önlemlerinin alınması tavsiye edilir(12).

8. Sözkonusu test yönteminin bir eksikliği, tavşan oküler tahriş edicilik test yöntemiyle değerlendirilen bazı oküler etkileri ve belli düzeyde ağırlık durumunu dikkate alsa da, konjonktiv (göz zarı) ve iris lezyonu gözönünde bulundurmamasıdır. Ayrıca, kornea yaralarının düzelmesi BCOP deneyinde başlı başına değerlendirilemese de tavşan gözü çalışmalarına dayanılarak kornea yaralanmasının ilk derinliğine dair değerlendirmenin düzelebilir veya düzelemez nitelikte etkileri ayırt etmekte kullanılabileceği ileri sürülmektedir (13). Son olarak, BCOP gözün maruz kalmasıyla ilgili sistemik toksisite potansiyelinin değerlendirilmesine olanak tanımamaktadır.

9. BCOP'nin ciddi olmayan tahriş ediciler ile tahriş edici olmayan maddelerin teşhisinde yararları ve sınırları hakkında tespit çalışmaları halen sürmektedir (ayrıca bkz. paragraf 45). BCOP test yönteminin ciddi olmayan tahriş ediciler ile tahriş edici olmayan maddelerin teşhisi dahil olmak üzere gelecekteki olası kullanımlarının resmi değerlendirmesi için kullanıcıların numuneleri ve/veya bulguları değerlendirme kuruluşlarına göndermeleri önerilmektedir.

10. Bu deneyin ilk defa yapılacağı laboratuvarlardaEk-II'de belirtilen test yeterlilik referans kimyasallarının kullanılması gerekmektedir. Laboratuvarlar BCOP deneyi verilerini mevzuata göre zararlılık sınıflandırması için sunmadan önce bu kimyasalları kullanarak BCOP test yöntemini kullanabilme yeterliliklerini ortaya koyabilirler.

TEST İLKESİ

11. BCOP test yöntemi sığır korneasının normal fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonunu kısa vadeli olarak in vitro sürdüren organotipik bir modeldir. Bu test yönteminde test maddesinin yol açtığı hasar kornea opaklığındaki değişimin opaklık ölçerle, kornea geçirgenliğindeki değişimin görünür ışık spektrofotometresiyle ölçülmesi sonucu elde edilen nicel verilerle değerlendirme yapılır. Her iki ölçümden elde edilen değerler test maddesinin in vivooküler tahriş olma potansiyelini öngörecek in vitrotahriş edicilik zararlılık sınıflandırma kategorisini belirlemekte kullanılacak olan IVIS değerinin hesaplanmasında kullanılacaktır (bkz. Sonuç kriterleri).

12. BCOP test yönteminde yeni kesilmiş sığırların gözlerindeki izole kornea kullanılır. Kornea opaklığı korneadan geçen ışık miktarı üzerinden ölçülür. Geçirgenlik, korneanın

tamamından geçerek arka odacıktaki ortamda saptanan sodyum floresin boyası miktarıyla ölçülür. Test maddeleri kornea tutucuları ön odacığına eklenmek suretiyle korneanın epitel yüzeyine tatbik edilirler. BCOP deneyinde kullanılan kornea tutucunun tanımı ve çizimi Ek III'te yer almaktadır. Kornea tutucuları farklı kaynaklardan ticari olarak elde edilebilir veya imal edilebilirler.

Sığır Gözlerinin Kaynağı ve Yaşı ile Hayvan Türlerinin Seçimi

13. Mezbahalara gönderilen sığırlar insanlar tarafından tüketilmek veya diğer ticari amaçlar için öldürülmektedir. BCOP uygulaması için yalnızca insan besin zincirinde yer almaya uygun sağlıklı hayvanların korneaları kullanılacaktır. Sığırlarda ırklara, yaşa ve cinsiyete göre ağırlık çok çeşitli olduğundan dolayı hayvanın kesimi için tavsiye edilen bir ağırlık bulunmamaktadır.

14. Değişik yaşlarda hayvanlardan alınan kornealar kullanıldığında kornea boyutları da değişik olmaktadır. Yatay çapı >30.5 mm ve orta kornea kalınlığı (CCT) > 1100 µm değerlerinde olan kornealar genellikle sekiz yaşından büyük sığırlardan, Yatay çapı < 28,5 mm ve CCT < 900 µm değerlerinde olan kornealar ise beş yaşından küçük sığırlardan elde edilmektedir (14). Bu nedenle 60 aydan büyük sığırların korneaları çoğunlukla kullanılmamaktadır. 12 aydan küçük sığırların korneaları gözler gelişim aşamasında olduğu ve kornea kalınlığı ile kornea çapı yetişkin sığırlarda bildirilenden çok daha küçük olduğu için kullanılmamaktadır. Ancak, daha kolay bulunabilmesi, dar yaş aralığı ve çalışanların Sığır SponjiyözEnsefalopatisine maruz kalma riskinin düşük olması gibi avantajlar sözkonusu ise küçük hayvanların (6 ila 12 aylık) kornealarının kullanılması da mümkündür (15). Kornea boyu veya kalınlığının aşındırıcı ve tahriş edici maddelere tepkide oynadığı rolün değerlendirilmesi için çalışmada kullanılan korneaların alındığı hayvanların tahmini yaşlarının ve/veya ağırlıklarının da bildirilmesi önerilir.

Gözlerin Toplanması ve Laboratuvara Taşınması

15. Gözler mezbaha çalışanlarınca toplanacaktır. Gözlere verilebilecek mekanik veya diğer türden zararları azaltmak için gözler ölümden hemen sonra çıkartılacaktır. Gözlerin tahriş olma potansiyeli bulunan maddelere maruz kalmaması için mezbaha çalışanları hayvan kafalarını yıkarken deterjan kullanmayacaktır.

16. Gözler uygun boyda bir kap içinde tamamıyla Hanks' Dengeli Tuz Çözeltisine (HBSS) batırılacak ve bozulmayı ve/veya bakteriyel kirlenmeyi engellemek için bu şekilde laboratuvara taşınacaktır. Gözler kesim işlemleri sırasında toplandığı için kana ve bakteriler ve diğer mikroorganizmalar gibi biyolojik maddelere maruz kalmış olabilirler. Bu nedenle, kirlenme riskinin azaltılması büyük önem taşımaktadır. Örneğin gözlerin bulunduğu kap ıslak buz üzerinde saklanabilir, gözlerin taşıma sırasında korunduğu HBSS'ye 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin gibi antibiyotikler eklenebilir.

17. Korneaların toplanması ile BCOP deneyinde kullanılması arasındaki zaman aralığı en aza indirilmeli (kornealar toplanıldıkları gün kullanılmalı) ve deney sonuçlarına olası etkisi yönünden belirtilmelidir. Bu sonuçlar pozitif ve negatif kontrol tepkilerinin yanı sıra göz seçme kriterleriyle de belirlenmektedir. Deneyde kullanılan gözlerin tamamı belli bir günde toplanmış aynı grup gözlerden olacaktır.

BCOP Deneyinde Kullanılacak Gözler İçin Seçme Kriterleri

18. Gözler laboratuvara gelir gelmez, artan opaklık, çizikler ve neovaskülerizasyon kusurları dikkatle incelenecektir. Yalnızca bu türden kusurları bulunmayan gözler kullanılabilir.

19. Her korneanın kalitesi deneyin diğer aşamalarında da değerlendirilecektir. Bir saatlik dengeleme süresi sonunda opaklık birimi yediden fazla olan kornealar atılacaktır (NOT: opaklık ölçerin kalibrasyonuopaklık birimini belirlemek için kullanılan opaklık standartlarında yapılacaktır, bkz. Ek III).

20. Her bir uygulama grubu (test materyali, eşzamanlı negatif ve pozitif kontroller) en az üç gözden oluşacaktır. BCOP deneyindeki negatif kontrol kornealarıiçin üç kornea kullanılacaktır. Korneaların hepsi bütün göz küresinden kesildiği ve kornea odalarına oturduğu için malzemelerin tekil kornea opaklığı ve geçirgenliği değerlerini (negatif kontrol dahil) tutma potansiyeli mevcuttur. Ayrıca, negatif kontrol kornealarından elde edilen opaklık ve geçirgenlik değerleri IVIS hesaplamalarındaki test maddesini ve pozitif kontrolden gelen kornea opaklığı ve geçirgenliği değerlerini düzeltmek için kullanılmaktadır.

İŞLEM

Gözlerin Hazırlanması

21. Kusur bulunmayan kornealar tutmayı kolaylaştırmak için 2 ila 3 mm kenarlı göz akı bırakılacak şekilde kesilirler. Kornea epiteline ve endoteline zarar vermemek için özen gösterilir. İzole kornealar ön ve arka odacıklara sahip, korneanın epitel ve endotel taraflarına ayrı ayrı temas eden özel tasarımlı kornea tutucularına oturtulurlar. Odacıkların her biri önceden ısıtılmış Eagle's Minimum Öz Maddesi (EMEM) ile sonuna kadar doldurulurlar (arka odacık önce olmak üzere). Kabarcık oluşmamasına dikkat edilir. Daha sonra cihazın en az bir saat boyunca 32 ± 1 °C sıcaklıkta dengelemesi yapılarak kornealarınmaddeyle dengelenmesi ve mümkün olduğunca normal metabolik faaliyete ulaşmaları sağlanır (kornea yüzeyi için in vivoyaklaşık sıcaklık 32 °C).

22. Dengeleme süresinden sonra odacıkların ikisine de taze, önceden ısıtılmış EMEM eklenir ve her korneanın taban opaklık değerleri okunur. Makroskopik doku hasarı (örneğin çizikler, pigmentasyon, neovaskülerizasyon) veya opaklık> 7 opaklık birimi görülen kornealar atılır. Dengelenen kornealarıntamamının ortalama opaklığı hesaplanır. Opaklık değerleri tüm korneaların ortalama değerine yakın olan en az üç kornea negatif (veya çözücü) kontrol kornealarıolarak seçilir. Kalan kornealar tekrar işlem ve pozitif kontrol gruplarına dağıtılır.

23. Suyun ısı kapasitesi havanınkinden daha yüksek olduğu için su inkübasyoniçin daha sabit sıcaklık koşulları sağlar. Bu yüzden kornea tutucusunun ve aksamının bakımında 32 ± 1 °C sıcaklıkta su banyosu önerilir. Ancak, sıcaklığı sabit tutmaya özen gösterilerek (örneğin, tutucuları ve maddeyi önceden ısıtarak) hava inkübatörleri kullanılabilir.

Test Materyalinin Uygulanması

24. Biri sıvılar ve yüzey aktif maddeler (sıvı veya katı), diğeri yüzey aktif madde olmayan katı maddeler için olmak üzere iki farklı uygulama protokolü kullanılmaktadır.

25. Sıvılar seyreltilmeden test edilmekte, yüzey aktif maddeler ise % 10ağırlık/hacim olarak % 0,9sodyum klorür çözeltisi, damıtık su veya test sisteminde olumsuz etki yapmayacağı kanıtlanmış diğer bir çözücüden oluşan çözeltide test edilmektedir. Yarı katılar, kremler ve cilalar sıvı olarak test edilmektedir. Farklı seyreltme çözeltileri kullanıldığında yeterli gerekçelerin sunulması gerekmektedir. Kornealar 10 dakika süreyle sıvılara ve yüzey aktif maddelere maruz bırakılırlar. Diğer maruz bırakma süreleri uygulanmışsa yeterli bilimsel gerekçe sunulması gerekmektedir.

26. Yüzey aktif madde olmayan katı maddeler % 20 konsantrasyonla % 0,9 sodyum klorür çözeltisi, damıtık su veya test sisteminde olumsuz etki yapmayacağı kanıtlanmış diğer bir çözücüden oluşan çözeltide test edilmektedir. Bazı hallerde ve uygun bilimsel nedenlerin varlığında katılar kornea yüzeyine doğrudan tatbik etmek ve açık odacık yöntemi kullanılmak suretiyle (bkz.paragraf 29) yalın halde de test edilebilirler. Kornealar katı maddelere dört saat süresince maruz bırakılırlar. Sıvılar ve yüzey aktif maddelerde olduğu gibi diğer maruz bırakma süreleri uygulanmışsa yeterli bilimsel gerekçe sunulması gerekmektedir.

27. Test materyalinin fiziksel yapısı ve kimyasal özelliklerine (örneğin katı maddeler, sıvılar, viskoz sıvılar ve viskoz olmayan sıvılar) bağlı olarak değişik uygulama yöntemleri kullanılabilir. Kritik faktör; test materyalinin epitel yüzeyini uygun biçimde kaplaması ve temizleme aşamasında doğru şekilde temizlenebilmesidir. Viskoz olmayan ve az viskoz olan sıvı test materyalleri için genellikle kapalı odacık yöntemi uygulanmaktadır. Yarı viskoz ve tam viskoz sıvı test materyalleri ile yalın katı maddeler için ise açık odacık yöntemi uygulanmaktadır.

28. Kapalı odacık yönteminde korneanın epitel tarafını örtmeye yetecek test materyali (750 µl) odacığın üst yüzeyindeki dozaj delikleri kullanılarak arka odacığa verilir ve sonra, maruz kalma sırasında delikler odacık tıpalarıyla kapatılır. Her korneanın test materyaline uygun süre boyunca maruz bırakılması önemlidir.

29. Açık odacık yönteminde ön odacığın pencere kapatma halkası ve cam penceresi işlemden önce çıkarılır. Kontrol veya test materyali (750 µlveya korneayı tamamen örtecek test materyali) mikro pipet yardımıyla epitel yüzeyine doğrudan uygulanır. Test materyalinin pipete yerleştirilmesi zor olduğu durumda test materyali dozaja yardımcı pozitif yer değiştirme pipetine basınçla doldurulabilir. Pozitif yer değiştirme pipetinin ucu şırınganın dağıtım ucuna yerleştirilerek yer değiştirme ucuna basınçla doldurulabilir. Aynı zamanda pipet pistonu yukarıya çekilirken şırınga pompası bastırılır. Pipet ucunda hava kabarcıkları belirirse test maddesi kaldırılır (boşaltılır) ve işlem uç hava kabarcığı olmadan doldurulana kadar tekrar edilir. Uygun test materyali hacminin ölçümüne ve kornea epitel yüzeyine daha kolay uygulamasına izin verdiği için gerekirse iğnesiz, normal bir şırınga kullanılabilir. Dozajın ardından cam pencere tekrar ön odacığa yerleştirilir ve kapalı sistem tekrar oluşturulur.

Maruz Kalma Sonrası İnkübasyon

30. Maruz kalma süresinden sonra test maddesi, negatif kontrol veya pozitif kontrol maddesi ön odacıktan çıkarılır ve epitel en az üç defa ya da test maddesinden görünür eser kalmayıncaya kadar fenol kırmızılı EMEM ile yıkanır. Asidik veya alkali materyallerin yıkanmasında fenol kırmızısındaki renk değişimi yıkamanın etkinliğini izlemeyi olanaklı

kıldığı için yıkama işleminde fenol kırmızısı içeren deney maddesi kullanılır. Fenol kırmızısında renk değişimi (sarı veya mor) gözlenmeye devam ediyorsa veya test maddesi halen görünür haldeyse kornealar üç defadan fazla yıkanır. Ortam test maddesinden tamamen temizlenmişse kornealar fenol kırmızısı içermeyen EMEM ile son kez bir daha yıkanır. EMEM (fenol kırmızısı içermeyen) opaklık ölçümü öncesinde fenol kırmızısının ön odacıktan temizlenmesinde yıkama maddesi olarak kullanılır. Ön odacık daha sonra fenol kırmızısı içermeyen yeni EMEM ile tekrar yıkanır.

31. Sıvılar veya yüzey aktif maddelerde yıkama işleminin ardından kornealar 32 ± 1 °C sıcaklıkta iki saat boyunca inkübeedilir. Bazı koşullarda ve durumun gerektirdiği hallerde tatbik sonrası süre daha uzun tutulabilir. Katı maddeler tatbik edilen kornealar dört saatlik maruz kalma süresinin ardından iyice yıkanır ama inkübasyona ihtiyaç yoktur.

32. Sıvılar veya yüzey aktif maddelerde tatbik sonrası inkübasyon süresinin, yüzey aktif madde olmayan katı maddelerde dört saatlik maruz kalma süresinin bitiminde her korneanın opaklığı ve geçirgenliği kaydedilir. Ayrıca her kornea görsel olarak incelenir ve ilgili bulgular kaydedilir (doku soyulması, kalan test maddesi, aynı olmayan opaklık yapıları gibi). Opaklık ölçme okumalarında farklılıklara yol açabilecekleri için bu gözlemler önemlidir.

Kontrol Maddeleri

33. Her deneyde eşzamanlı negatif veya çözücü/taşıyıcı kontrolleri ve pozitif kontroller yer alacaktır.

34. Sıvı bir maddenin % 100oranında test edilmesi durumunda eşzamanlı negatif kontrol (örneğin % 0,9 sodyum klorür çözeltisi veya damıtık su) BCOP test yöntemine test sisteminde görülen özgül olmayan değişimlerin tetkik edilebileceği ve deney sonuçları yönünden taban sağlayacak şekilde dâhil edilir. Ayrıca, deney koşullarının uygun olmayan tahriş edici tepkisine neden olmaması da sağlanmalıdır.

35. Seyreltilmiş sıvının, yüzey aktif maddenin veya katı maddenin test edilmesi durumunda eşzamanlıçözücü/taşıyıcı kontrolü BCOP test yöntemine test sisteminde görülen özgül olmayan değişimlerin tetkik edilebileceği ve deney sonuçları yönünden temel hat sağlayacak şekilde dâhil edilir. Yalnızca test sisteminde olumsuz etki yaratmayacağı kanıtlanmış çözücü/taşıyıcı kullanılabilir.

36. Uygun tepki oluştuğunu doğrulamak için her deneyde bilinen bir oküler tahriş edici eşzamanlı pozitif kontrol olarak kullanılır. BCOP deneyi bu test yönteminde aşındırıcı veya ciddi tahriş edicileri teşhis etmek için kullanıldığından, pozitif kontrolün ciddi tepkiye yol açan bir madde olması test yönteminde tercih edilir. Ancak, pozitif kontrol tepkisinde zamana göre farklılıkların değerlendirilebilmesi için tahriş edici tepkisi boyutlarının çok ciddi düzeyde olmaması gerekir.

37. Sıvı test materyalleri için pozitif kontrol olarak örneğin % 1 sodyum hidroksit kullanılabilir. Katı test materyalleri için pozitif kontrol olarak ise % 0,9 sodyum klorür çözeltisi içinde % 20 (ağırlık/hacim) imidazol kullanılabilir.

38. Belirli kimyasal veya ürün sınıfından olup bilinmeyen kimyasalların oküler tahriş edicilik potansiyelini veya belli bir tahriş edici tepki aralığındaki oküler tahriş edicilerin göreceli

tahriş edicilik potansiyelini değerlendirirken referans maddelerin kullanılması yararlı olacaktır.

Sonlanma Noktası Ölçümleri

39. Opaklık korneadan geçen ışık miktarına göre belirlenir. Kornea opaklığının nicel ölçümü opaklık ölçer ile, sürekli ölçekte opaklık değerleri elde ederek gerçekleştirilir.

40. Geçirgenlik bütün kornea hücre katmanlarından, yani kornea dış yüzeyi epitelinden ve kornea iç yüzeyi endotelinden geçen sodyum floresin boyasının miktarıyla belirlenir. 1 ml sodyum floresin çözeltisi (test sırasında sıvılar ve yüzey aktif maddeler için 4 veya yüzey aktif madde olmayan katı maddeler için 5 mg/ml) korneal tutucunun korneanın epitel tarafına gelen ön odacığına eklenir. Korneal tutucunun korneanın endotel tarafına gelen arka odacığına ise yeni EMEM doldurulur. Tutucu daha sonra 90 ± 5 dakika süreyle ve 32 ± 1 °C sıcaklıkta yatay olarak inkübeedilir. Arka odacığa geçen sodyum floresin miktarı UV/VIS spektrofotometresi yardımıyla ölçülür. Spektrofotometre ölçümleri 490 nm seviyede değerlendirilir ve sürekli ölçekte edinilmiş optik yoğunluk (OD490) veya soğurma değerleri olarak kaydedilir. Floresin geçirgenlik değerleri standart 1 cm yol uzunluğunda görünür ışık spektrofotometresinden elde edilen değerlerde OD490 değerleri kullanılarak elde edilir.

41. Farklı bir yöntem olarak, (i) Plaka okuyucunun floresin OD490 değerlerini belirleyecek doğrusal aralık değerleri belirlenebilir olması (ii) 96 kuyu plakada (96 well microtitre plate) kullanılacak floresin numunelerinin hacmi standart 1 cm yol uzunluğuyla elde edilecek OD490 değerlerini karşılaması durumunda 96 kuyulu mikroplaka okuyucu da kullanılabilir(bu durumda tamamen dolu kuyu [genellikle 360 ml] gerekli olabilir).

VERİLER VE RAPORLAMA

Veri Değerlendirmesi

42. Arka plan opaklığı ve negatif kontrol geçirgenlik OD490 değerleri için opaklık ve ortalama geçirgenlik (OD490) değerleri doğrulandığında her uygulama grubundaki ortalama opaklık ve geçirgenlik OD490 değerleri her bir grupta in vitrotahriş edicilik puanını (IVIS) hesaplamak için kullanılan aşağıdaki ampirik formülle birleştirilecektir.
IVIS = ortalama opaklık değeri + (15 x ortalama geçirgenlik OD490 değeri)

43. Sina ve arkadaşları (16) bu formülün kurum içi ve laboratuvarlar arası çalışmalardan belirlendiğini ifade etmiştir. Çok laboratuvarlı bir çalışmada 36 bileşik için ortaya konan veriler in vivove in vitro veriler arasında en uygun denklemi belirlemek için çok değişkenli analize tabi tutulmuştur. Bu analiz iki ayrı şirketteki bilim adamları tarafından yapılmış, neredeyse özdeş denklemlere ulaşılmıştır.

44. Opaklık ve geçirgenlik değerleri test materyalinin yol açtığı aşındırıcılık veya ciddi tahriş ediciliğin iki sonlanma noktasından sadece birinden mi gerçekleştiğini belirlemek için ayrıca bağımsız olarak değerlendirilmelidir (bkz. Karar Kriterleri).

Karar Kriterleri

45. IVIS > 55,1 değerine yol açan maddeler aşındırıcı veya ciddi tahriş edici olarak kabul edilir. Paragraf 1'de belirtildiği üzere test materyali oküler aşındırıcı veya ciddi tahriş edici olarak tanımlanmazsa mevzuata göre sınıflandırma ve etiketlemeyapabilmek için ek testler gerekir. BCOP test yöntemi EPA (1), AB (2) veya GHS (3) sınıflandırma sistemlerine göre sınıflandırılmış toplamda % 79 (113/143) ila % 81 (119/147) kesinliğe sahip olup, in vivo tavşan gözü test yöntemi verileriyle karşılaştırıldığında hatalı pozitif oran % 19 (20/103) ila % 21 (22/103) ve hatalı negatif oran % 16 (7/43) ila % 25 (10/40) düzeyindedir. Belirli kimyasal (alkoller, ketonlar) veya fiziksel (katı maddeler) kategorilerden maddeler veritabanından çıkarıldığında AB, EPA ve GHS sınıflandırma sistemlerine göre BCOP kesinliği % 87 (72/83) ila % 92 (78/85), hatalı pozitif oranlar % 12 (7/58) ila % 16 (9/56) ve hatalı negatif oranlar % 0 (0/27) ila % 12 (3/26) düzeyinde gerçekleşmektedir.

46. Test materyalinin oküler aşındırıcı veya ciddi tahriş edici olarak sınıflandırılmaması durumunda dahi BCOP verileri in vivotavşan gözü testinden veya doğrulanmış bir in vitrotestten elde edilen verilerle birlikte BCOP test yönteminin ciddi olmayan tahriş ediciler ile tahriş edici olmayan maddelerin teşhisinde kullanışlılığı ve sınırlarının daha iyi değerlendirilmesine yardımcı olabilir.

Çalışma Kabul Kriterleri

47. Pozitif kontrolün ortaya çıkardığı IVIS en az üç ayda bir veya testlerin düşük sıklıkla, yani ayda birden daha az yapıldığı hallerde laboratuvarlarda kabul edilebilir testin her yapılışından sonra güncellenecek tarihsel ortalamanın iki standart sapmasına denk düşüyorsa test kabul edilebilir sayılır. Negatif veya çözücü/taşıyıcı kontrol tepkileri negatif veya çözücü/taşıyıcı kontrol perspektifiyle işlemden geçirilmiş sığır kornealarıiçin belirlenmiş arka planopaklık ve geçirgenlik değerlerinin üst sınırlarından daha düşük opaklık ve geçirgenlik değerleri ortaya koymalıdır.

Test Raporu

48. Test raporu çalışmanın yürütülmesine göre aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test ve Kontrol Maddeleri

- Kimyasal Kuramlar Servisi (Chemical Abstracts Service -CAS) tarafından kullanılan ad ve biliniyorsa, ardından diğer isimler,
- Biliniyorsa CAS Numarası,
- Biliniyorsa maddenin veya karışımın (ağırlık yüzdesi olarak) aralığı ve bileşimi,
- Çalışmanın yürütülmesiyle ilgili olarak fiziksel durum, uçuculuk, pH, sabitlik, kimyasal kategori, su çözünürlüğü gibi fiziksel ve kimyasal özellikler,
- Uygulanıyorsa, test/kontrol maddeleri üzerinde test öncesinde yapılan ısıtma, öğütme gibi işlemler,
- Biliniyorsa sabitlik.

Sponsor ve Tesisle İlgili Bilgiler

- Sponsorun, tesisin ve çalışma direktörünün adları ve adresleri,
- Gözlerin alındığı kaynak (toplandıkları tesis),
- Gözlerin depolanma ve taşınma koşulları (toplanma günü ve saati, teste başlamadan önce geçen süre, taşıma araçları ve sıcaklığı, kullanılan antibiyotikler gibi),

- Biliniyorsa gözleri toplanan hayvanların özellikleri (donör hayvanın yaşı, cinsiyeti, ağırlığı gibi).

Test Yöntemi ve Protokolün Kullanılma Gerekçeleri
- Test Yöntemi Bütünlüğü
- Test yönteminin bütünlüğünü (kesinliğini ve güvenilirliğini) süreç boyunca korumaya yönelik işlemler (test yeterlilik referans maddelerinin periyodik testleri, geçmiş negatif ve pozitif kontrol verilerinin kullanılması gibi).

Testin Kabul Edilebilirlik Kriterleri
- Geçmiş verilere dayanan kabul edilebilir eşzamanlı pozitif ve negatif kontrol aralıkları,
- Uygulanabiliyorsa geçmiş verilere dayanan eşzamanlı referans kontrol aralıkları.

Test Koşulları
- Kullanılan test sisteminin tanımlanması,
- Kullanılan kornea tutucusunun türü,
- Opaklık ölçücü ve spektrofotometre gibi opaklık ve geçirgenlik ölçen cihazların kalibrasyon bilgileri,
- Kullanılan sığır kornealarının vasıfları ve diğer bilgiler,
- Kullanılan test prosedürüne ilişkin bilgiler,
- Kullanılan test materyali konsantrasyonu,
- Test prosedüründe herhangi bir değişiklik yapılmışsa tanımlanması,
- Modelin geçmiş verilerine (negatif ve pozitif kontroller, yeterlik maddeleri, referans maddeler gibi) atıflar,
- Kullanılan değerlendirme kriterlerinin tanımlanması.

Sonuçlar
- Tekil test numunelerinden gelen verilerin tablo haline getirilmesi (örneğin test maddesi, pozitif, negatif ve mevcutsa referans kontroller için opaklık ve OD_{490} değerleri ile hesaplanan IVIS mevcutsa çoklu tekrar deneylerinden elde edilen verilerle birlikte tablo olarak belirtilir ve her tekil deneydeki ± standart sapmayı gösterir.),
- Gözlemlenen diğer etkilerin tanımlanması.

Sonuçların Tartışılması.
Sonuç.

KAYNAKLAR

(1) U.S. EPA (1996). LabelReview Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
(2) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of theCouncil of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, andamendingRegulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.
(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revisededition, New York &Geneva: United Nations Publications, 2007. Available:[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eyeirritants. Available:[http://ecvam.jrc.it/index.htm]
(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report –In Vitro OcularToxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on theValidation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
(6) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of theCouncil of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a A European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC andCommission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396, 30.12.2006, p. 1.
(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available:
[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]
(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report –In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Inter-agency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
(9) ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No: 06-4512. ResearchTriangle Park: NationalToxicology Program. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for theValidation of Alternative Methods (ECVAM).
(11) Gautheron, P.,Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovinecornealopacityandpermeability test: Anin vitroassay of ocularirritancy.Fundam. Appl. Toxicol.18:442-449.
(12) Siegel, J.D.,Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., andthe Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available:
[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].
(13) Maurer, J.K.,Parker, R.D. andJester, 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. andMacmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse.Can. J. Zool.73:2159-2165.
(15) Collee, J. andBradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. TheLancet 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 ey eirritation test using pharmaceutica lintermediates. Fundam.Appl Toxicol26:20-31.
(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]
(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

Ek-I

TANIMLAR

Doğruluk: Test yöntemi sonuçları ile kabul edilen referans değerler arasındaki uyuşma düzeyi. Test yöntemi performansını ölçmek için kullanılır ve 'bağıntılılık' kavramının bir yönüdür. Bu terim sık sık 'uyuşma' kavramıyla karşılanarak test yönteminden kaynaklanan doğru sonuçlar anlamında kullanılır.

Referans madde: Test maddesi ile karşılaştırmada standart olarak kullanılan madde. Referans maddenin şu özellikleri taşıması gerekir: (i) Sürekli ve güvenilir kaynaklar, (ii) Test konusu maddeler sınıfıyla yapısal ve işlevsel benzerlik, (iii) Bilinen fiziksel/kimyasal özellikler, (iv) Bilinen etkiler hakkında destekleyici veriler ve (v) İstenen tepki aralığında bilinen kuvvet.

Kornea: Göz küresinin önünde yer alan ve iris ile pupillayı kaplayarak içeriye ışık ileten saydam kısım.

Kornea opaklığı: Test materyali tatbik edildikten sonra korneada ölçülen opaklık düzeyi. Artan kornea opaklığı korneanın hasar gördüğünü gösterir. Opaklık Draize tavşan gözü testinde olduğu gibi öznel olarak veya opaklık ölçer gibi bir cihazla nesnel olarak değerlendirilebilir.

Kornea geçirgenliği: Kornea hücre tabakalarının tamamından geçen sodyum floresin boyası miktarı üzerinden belirlenen kornea epiteli üzerindeki ölçülen hasar miktarı.

EPA Kategorisi 1: 21 günden daha fazla süren aşındırıcı (göz dokusunda kalıcı hasar) veya kornea etki ya da tahriş olması (1).

ABKategorisi R41: Test materyalinin gözün dış yüzeyine tatbikinden sonra ortaya çıkan ve uygulamadan sonra 21 gün içinde tam olarak düzelmeyen doku hasarı veya ciddi görme bozukluğu (2).

Yanlış negatif oran: Test yöntemi tarafından yanlış olarak negatif teşhis edilen bütün pozitif maddelerin oranı. Test yöntemi performansının göstergelerinden birisidir.

Yanlış pozitif oran:Test yöntemi tarafından yanlış olarak pozitif teşhis edilen bütün negatif maddelerin oranı. Test yöntemi performansının göstergelerinden birisidir.

GHS (Kimyasalların Sınıflandırılması ve Etiketlenmesinde Küresel Uyumlaştırma Sistemi): Kimyasalları (maddeler ve karışımlar) standart tip ve fiziksel, sağlık ve çevresel zararlılık düzeylerine göre sınıflandıran, zararlılık işaretleri, uyarı kelimeleri, zararlılık ifadeleri, önlem ifadeleri ve güvenlik bilgi formlarıgibi iletişim araçlarla insanlar (çalışanlar, taşımacılar, tüketiciler, acil yardım personeli gibi) ve çevre üzerinde olumsuz etkileri hakkında bilgininiletimini sağlayan sistem(3).

GHS Kategorisi1: Test materyalinin gözün dış yüzeyine tatbikinden sonra ortaya çıkan ve uygulamadan sonra 21 gün içinde tam olarak düzelmeyen doku hasarı veya ciddi görme bozukluğu (3).

Zarar: Bir maddenin veya bu maddeye maruz kalma durumunun maruz kalan sistem veya (alt) popülasyon üzerinde olumsuz etkide bulunma potansiyeli.

*Invitro*Tahriş Edicilik Puanı (IVIS): BCOP deneyinde her uygulama grubunun ortalama opaklık ve ortalama geçirgenlik değerlerinin her grup için tek bir *in vitro*puan olarak birleştirildiği ampirik formül. *IVIS* = ortalama opaklık değeri + (15 *ortalama geçirgenlik değeri).

Negatif kontrol: Test sisteminin bütün bileşenlerini içeren işlemsiz tekrar. Bu numune test materyali tatbik edilmiş numunelerle ve diğer kontrol numuneleri ile işlenerek çözücünün test sistemiyle etkileşim içinde olup olmadığı saptanır.

Tahriş edici olmayan madde: EPA Kategorisi I, II veya III; AB Kategorisi R41 ve R36; veya GHS Kategorisi 1, 2A, veya 2B oküler tahriş ediciler kapsamında olmayan maddeler.

Oküler aşındırıcı: (a) Göz dokusunda kalıcı hasara yol açan maddeler, (b) GHS Kategorisi 1, EPA Kategorisi I veya AB Kategorisi R41 oküler tahriş ediciler kapsamında yer alan maddeler (1) (2) (3).
Oküler tahriş edici: (a) Gözün dış yüzeyine tatbik edilmesinin ardından göz üzerinde giderilebilir değişime yol açan maddeler, (b) EPA Kategorisi II veya III, AB Kategorisi R36 ya da GHS Kategorisi 2A veya 2B oküler tahriş ediciler kapsamında yer alan maddeler (1) (2) (3).
Oküler ciddi tahriş edici: (a) Gözün dış yüzeyine tatbik edilmesinin ardından 21 gün içinde düzelmeyen doku hasarına yada ciddi görme kaybına yol açan maddeler, (b) GHS Kategorisi 1, EPA Kategorisi I ya da AB Kategorisi R41 oküler tahriş ediciler kapsamında yer alan maddeler (1) (2) (3).
Opaklık ölçücü: 'Korneaopaklığını" korneadan geçen ışığı değerlendirerek ölçen cihaz. Tipik cihazın iki kısmı bulunmakta olup her biri kendi ışık kaynağına ve fotoseline sahiptir. Kısımlardan biri işlemden geçirilmiş kornea için kullanılırken diğeri cihazın kalibrasyonu ve sıfırlaması için kullanılır. Halojen lamba ışığı kontrol kısmından (pencere ve sıvı bulunmayan boş odacık) fotosele gönderilir ve korneanın bulunduğu odacığı içeren deney kısmından fotosele gönderilen ışıkla karşılaştırılır. Fotosellerden ışık iletimindeki fark karşılaştırılır ve sayısal opaklık değeri dijital ekranda gösterilir.
Pozitif kontrol: Test sisteminin bütün bileşenlerini içeren ve pozitif tepki doğuracağı bilinen bir maddeyle işlem yapılan tekrar. Pozitif kontrol tepkisindeki değişkenliğin süreç boyunca değerlendirilebilmesi için ciddi tepkinin boyutu çok ileri düzeyde olmamalıdır.
Güvenilirlik: Farklı zamanlarda aynı laboratuvarda ve farklı laboratuvarlarda aynı protokol kullanıldığında test yöntemindeki ölçümlerin yeniden üretilebilirlik düzeyi. Laboratuvar içinde ve laboratuvarlar arasında yeniden üretilebilirlik ile laboratuvar içinde tekrar edilebilirlik hesaplanarak değerlendirilir.
Çözücü/taşıyıcı kontrolü: Test sistemindeki test maddesi tatbik edilmiş çözücü veya taşıyıcı dahil bütün bileşenleri ve diğer kontrol numunelerini içeren aynı çözücü veya taşıyıcıda çözünen test maddesi tatbik edilmiş numuneler için taban tepki tespit etmeyi amaçlayan işlenmemiş numune. Bu numune eşzamanlı negatif kontrolle test edildiği zaman ayrıca çözücü veya taşıyıcının test sistemiyle etkileşime girip girmediğini de gösterir.
Aşamalı test: Test materyali hakkındaki mevcut bütün bilgilerin belirlenen sırayla gözden geçirildiği aşamalı bir test stratejisidir. Her bir sırada, sonraki sıraya geçmeden önce kanıt ağırlığı yaklaşımıyla tehlike sınıflandırması sonucuna ulaşılabilecek yeterli bilgi bulunup bulunmadığı kararlaştırılır. Test materyalinin tahriş edicilik potansiyeli mevcut bilgilere göre belirlenebiliyorsa ek testlere gerek duyulmaz. Test materyalinin tahriş edicilik potansiyeli mevcut bilgilere göre belirlenemiyorsa kesin sınıflandırma olanaklı hale gelinceye kadar ardışık hayvan testleri yapılır.
Doğrulanmış test yöntemi: Belirli bir amaca ilişkin bağıntılılık (doğrulukla birlikte) ve güvenilirlik değerlendirmesi için doğrulama çalışmalarının tamamlanmış olduğu test yöntemi. Doğrulanmış test yönteminin belirli amaç yönünden doğruluk ve güvenilirlik değerlendirmesinde yeterli performans gösteremeyebileceğini belirtmek gerekir.
Kanıt ağırlığı: Maddenin zarar potansiyeline ilişkin sonuca ulaşmak ve bu sonucu desteklemek için çeşitli verilerin yeterli ve yetersiz yönlerinin değerlendirilmesi süreci.

Ek-II

BCOP testin yeterliliği için referans maddeler

Bu test yöntemine ilişkin rutin kullanım öncesinde laboratuvarlar Tablo 1'de önerilen oküler aşındırıcılık sınıflandırmasını doğru yapabilmek konusunda teknik yeterliliklerini ortaya koyabilirler. Sözkonusu maddeler lokal göz tahriş olma/korozyonuna dair *in vivo*tavşan gözü testinden elde edilen tepkiler aralığını yansıtacak şekilde belirlenmiştir (TG 405) (örneğin 1, 2A, 2B veya BM GHS'ye göre sınıflandırılmamış ve etiketlenmemiş (3) (7)). Ancak, bu deneylerin doğrulanmış yararları gözönünde bulundurulduğunda (yalnızca oküler aşındırıcıların/ciddi tahriş edicilerin teşhisi yönünden), sınıflandırma yönünden (aşındırıcı/ciddi tahriş edici veya aşındırıcı/ciddi tahriş edici olmayan maddeler) yeterliği gösterebilecek sadece iki test sonucu mevcuttur. Diğer seçme kriterleri maddelerin ticari yolla edinilebilir olması, yüksek kalitede *in vivo*referans verilerin mevcut olması ve Test Talimatnamesinin oluşturulduğu iki *in vitro*yönteme ilişkin yüksek kaliteli veriler bulunmasıdır. Bu nedenle yeterlik maddelerinin ICCVAM tarafından *in vitro*oküler toksisite testi yöntemlerinin doğrulanması için önerilen 122 referans madde listesinden seçilmesi gerekmektedir (bkz. Ek H: ICCVAM Önerilen Referans Maddeler Listesi) (5). Referans veriler BCOP ve İzole Tavuk Gözü (ICE) test yöntemleri için ICCVAM Arka Plan Gözden Geçirme Belgelerinde mevcuttur (17) (18).

*Tablo 1.*BCOP deneylerinde teknik yeterlik için önerilen maddeler

Madde	CASRN	Kimyasal sınıfı (1)	Fiziksel Hali	*In Vivo* Sınıflandırması (2)	*In Vitro* Sınıflandırması (3)
Benzalkonyumklorid (% 5)	8001-54-5	Onyum bileşiği	Sıvı	Kategori 1	Aşındırıcı/Ciddi tahriş edici
Klorheksidin	55-56-1	Amin, Amidin	Katı	Kategori 1	Aşındırıcı/Ciddi tahriş edici
Dibenzoil-L-tartarik asit	2743-38-6	Karboksilik asit, Ester	Katı	Kategori 1	Aşındırıcı/Ciddi tahriş edici
İmidazol	288-32-4	Heterosiklik	Katı	Kategori 1	Aşındırıcı/Ciddi tahriş edici
Trikloroasetik asit (% 30)	76-03-9	Karboksilik Asit	Sıvı	Kategori 1	Aşındırıcı/Ciddi tahriş edici
2,6-Diklorobenzoil klorür	4659-45-4	Asil halid	Sıvı	Kategori 2A	Aşındırıcı/ciddi tahriş edici değil
Etil-2-metilaseto-asetat	609-14-3	Keton, Ester	Sıvı	Kategori 2B	Aşındırıcı/ciddi tahriş edici değil
Amonyum nitrat	6484-52-2	İnorganik tuz	Katı	Kategori 2A	Aşındırıcı/ciddi tahriş edici değil
Gliserol	56-81-5	Alkol	Sıvı	Etiketlenmemiş	Aşındırıcı/ciddi tahriş edici değil
n-Hekzan	110-54-3	Hidrokarbon (asiklik)	Sıvı	Etiketlenmemiş	Aşındırıcı/ciddi tahriş edici değil

Kısaltmalar: CASRN ~ ChemicalAbstracts Service Kayıt Numarası

*(*) Test materyallerine ilişkin kimyasal sınıflar National Library of MedicineMedicalSubjectHeadings (MeSH) sınıflama sistemine (http://www.nlm.nih.gov/mesh) göre oluşturulmuş standart sınıflandırma şeması uyarınca belirlenmiştir.

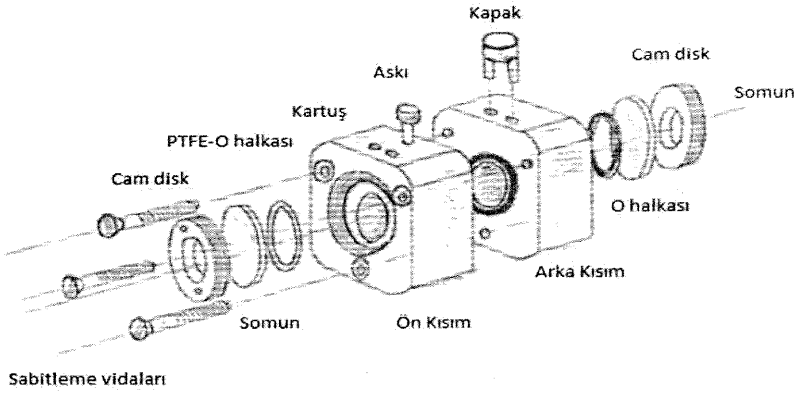
(2)Invivotavşan gözü testi (OECD TG 405) sonuçlarına göre ve BM GHS (3)(7) kullanılarak oluşturulmuştur.

(3)BCOP ve ICE sonuçlarına göre oluşturulmuştur.

Ek- III

BCOP KORNEA TUTUCUSU

1. BCOP kornea tutucuları polipropilen gibi inert bir malzemeden üretilir. Tutucular bir ön odacık ve bir arka odacık olmak üzere iki kısımdan oluşur ve iki adet silindirik benzer iç odacığa sahiptir. Her odacık 5 ml hacme sahiptir ve opaklık ölçümlerinin kaydedildiği cam bir pencereyle sonlanır. İç odacıkların her birinin çapı 1,7 cm ve derinliği 2,2 cm'dir[1]. Sızıntıyı önlemek için arka odacıkta bir o halka kullanılır. Kornealar endotel kısmı alta gelecek şekilde arka odacıkların o halkasına ve ön odacıklar da korneanın epitel tarafına yerleştirilir. Odacıklar iki paslanmaz cıvatayla odacığın dış kenarlarına sabitlenir. Her odacığın sonunda, korneaya daha rahat ulaşmak için çıkarılabilen cam pencere yer alır. Sızıntıyı önlemek için cam pencere ile odacıkla arasına da bir o halka yerleştirilir. Odacıkların üstündeki iki delik cihaz maddesinin ve test bileşiklerinin doldurulmasını ve boşaltılmasını sağlar. İşlem ve inkübasyon sorasında lastik tıpalarla kapalı tutulurlar.



OPAKLIK ÖLÇER

2. Opaklık ölçer ışık geçişini ölçen bir cihazdır. Halojen lamba ışığı kontrol kısmından (pencere ve sıvı bulunmayan boş odacık) fotosele gönderilir ve korneanın bulunduğu odacığı içeren deney kısmından fotosele gönderilen ışıkla karşılaştırılır. Fotosellerden ışık iletimindeki fark karşılaştırılır ve sayısal opaklık değeri dijital ekranda gösterilir. Opaklık birimleri belirlenir.

3. Opaklık ölçer Tahmin Modelinde tanımlanan değişik sınıflandırmalar için bariyerleri kapsayan (aşındırıcılık/ciddi tahriş edicilik belirleme bariyerine kadar) opaklık okumaları aralığı üzerinden doğrusal yanıt verebilecek şekilde olmalıdır. 75-80 opaklık birimine kadar doğrusal ve doğru okumalar için opaklık ölçerin bir dizi kalibratörlekalibrasyonunun yapılması gerekir. Kalibratörler (opak polyester tabakaları) kalibrasyon odacığına (kalibratörleri tutmak için tasarlanmış kornea odacığı) yerleştirilir ve opaklık ölçerle okunur. Kalibrasyon odacığı kalibratörleri ışık ve fotosele hemen hemen aynı mesafede tutarak korneaların opaklık ölçümü sırasında yerleştirilmelerine olanak tanıyacak şekilde tasarlanmıştır. Opaklık ölçer önce kalibrasyon odasına kalibratör yerleştirilmeksizin 0 opaklık biriminde kalibre edilir. Daha sonra kalibrasyon odacığına üç farklı kalibratör teker teker yerleştirilir ve opaklık değerleri ölçülür. 1, 2 ve 3 numaralı kalibratörlerinopaklık okumaları 75, 150 ve 225 opaklık birimi değerde ve her biri % ± 5 olmalıdır.

---

[1]Verilen boyutlar 12 ila 60 aylık inekler için kullanılan kornea tutuculardan alınmıştır. 6 ila 12 aylık hayvanlar kullanılıyorsa tutucunun odacık hacmi 4 ml, iç odacıkların çapı 1,5 cm ve derinliği 2,2 cm olacaktır. Yeni tasarlanmış kornea tutucularda dikkate edilmesi gereken husus maruz bırakılan kornea yüzeyinin arka odacık hacmine oranının eski kornea tutucularındaki oranla aynı olmasıdır. Bu durum önerilen formül kullanılarak yapılacak IVIS hesaplarındaki geçirgenlik değerlerinin doğru belirlenmesinde gereklidir.

B. 48. OKÜLER AŞINDIRICILAR VE CİDDİ TAHRİŞ EDİCİLERİ TEŞHİS İÇİN İZOLE TAVUK GÖZÜ TEST YÖNTEMİ

GİRİŞ

1. İzole tavuk gözü (ICE) test yöntemi Sığır korneası opaklığı ve geçirgenliği (BCOP) test yöntemi maddeleri ve karışımları bazı koşullarda ve belli sınırlamalarla "oküler aşındırıcı ve aşırı tahriş edici" olarak tanımlamak için kullanılabilen *in vitro*bir test yöntemidir (1) (2) (3). Bu test yöntemi açısından aşırı tahriş ediciler tavşanlara tatbik edildikten sonra en az 21 gün boyunca oküler lezyonlara yol açan tahriş edicilerdir. BCOP *in vivo*tavşan gözü testine tam bir alternatif olmasa da belli bir uygulama alanında düzenleyici sınıflandırma ve adlandırma için aşamalı test stratejisinin parçası olarak önerilmektedir (4) (5). Test edilen maddeler ve karışımlar (6) tavşanlarda ayrıca test yapmaya gerek kalmadan oküler aşındırıcı veya aşırı tahriş edici olarak kategorize edilebilirler. Test sonucu negatif çıkan maddenin, OECD Test Yönergesi 405 (7) (Ek'in B. 5 kısmı) gereğince ardışık test stratejisi kullanılarak tavşanlar üzerinde test edilmesine gerek kalmamaktadır.

2. Bu test yönteminin amacı test materyalinin oküler aşındırıcılık veya aşırı tahriş edicilik potansiyelinin çıkartılmış tavuk gözü üzerinde toksisite düzeyi ölçülmek suretiyle değerlendirecek usulleri belirlemektir. Kornea üzerinde toksik etkiler (i) nitel opaklık değerlendirmesi, (ii) göze floresin tatbik edilerek epitel üzerinde hasarın (floresintutunumu) nitel değerlendirmesi, (iii) kalınlık artışının (şişme) nicel ölçümü ve (iv) yüzey üzerinde makroskopik morfolojik hasarın nitel değerlendirmesi ile tespit edilir. Korneanın test materyaline maruz bırakılmasından sonra yapılan kornea opaklık, şişme ve hasar ölçümleri birleştirilerek, test materyalinin tahriş edicilik düzeyi sınıflandırılır.

3. 21 günden daha az sürede iyileşenlezyonlara yol açan oküler tahriş ediciler ve tahriş edici olmayan materyaller de ICE test yöntemi kullanılarak test edilmektedir. Ancak, bu kategorilerdeki maddeler için ICE test yönteminin kesinliği ve güvenilirliği tam olarak değerlendirilmemiştir.

4. Tanımlar Ek-I'de yer almaktadır.

ÖNCELİKLİ HUSUSLAR VE SINIRLAR

5. Bu test yöntemi Avrupa Alternatif Yöntemler Değerlendirme Merkezi, Japonya Alternatif Yöntemler Değerlendirme Merkezi ve Yaşam Kalitesi Toksikoloji ve Uygulamalı Farmakoloji Departmanı (TNO-Hollanda) katkılarıyla hazırlanan uluslararası değerlendirme çalışması (4)(5)(9) sonucunda Alternatif Yöntemlerin Değerlendirilmesi Konusunda Kurumlararası Koordinasyon Komitesi (ICCVAM) tarafından oluşturulan ICE test yöntemi protokolüne (8) dayanmaktadır. Protokol, yayımlanmış protokollerdeki bilgilere ve TNO tarafından halen kullanılan protokole dayanmaktadır (10) (11) (12) (13) (14).

6. Bu test yönteminin belirlenmiş sınırları;alkollerde, yanlış pozitif oranlardan ve katı ve yüzey aktif maddelerde yanlış negatif oranlardan kaynaklıdır (bkz. paragraf 47) (4).Bu kimyasal ve fiziksel sınıflardaki maddeler veri tabanından çıkarıldığı zaman AB, EPA ve GHS sınıflandırma sistemleri üzerinden ICE doğruluğu ciddi ölçüde iyileşir(4). Bu deneyin amacı, sadece oküler aşındırıcıların/aşırı tahriş edicilerin tespiti dikkate

alındığında, materyaller daha sonra tavşanlar üzerinde veya mevzuata göre kabul edilmiş bir diğer in vitro yöntemle, ardışık test stratejisi ve kanıt ağırlığı yaklaşımıyla test edileceği için yanlış negatif oranlar kritik düzeyde sayılmaz. Ayrıca, mevcut değerlendirme veri tabanı bazı kimyasal maddelerin ve karışımlar gibi bazı ürünlerin doğru şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamamaktadır. Bununla birlikte, araştırmacılar bu yöntemi kullanmayı oküler aşındırıcı veya aşırı tahriş edici tepkisi olarak pozitif sonuçlar beklenen hallerde her türden test materyali (karışımlar dâhil) için dikkate alabilirler. Yine de tahmin edilen değer, gerçek değerin çok üzerinde çıkabilme riski nedeniyle, alkoller için elde edilen pozitif sonuçlar daha dikkatle yorumlanmalıdır.

7. Tavuk gözleri ile yapılacak tüm işlemler test yerinde geçerli olan hayvansal materyallerin işlemden geçirilmesine ilişkin kurallara ve işlemlere bağlı kalmalıdır. Hayvansal materyaller sınıfına dokular ve doku sıvıları da dâhildir. Genel laboratuvar önlemlerinin alınması tavsiye olunur (15).

8. Tavşan oküler tahriş edicilik test yöntemiyle değerlendirilen bazı oküler etkileri ve belli düzeyde ağırlık durumunu dikkate alsa da sözkonusu test yönteminin sınırlılıklarından biri de konjonktiv ve iris lezyonları gözönünde bulundurmamasıdır. Ayrıca, kornea lezyonlarının düzelmesi ICE deneyinde başlı başına değerlendirilemese de tavşan gözü çalışmalarına dayanılarak korneadaki lezyonun ilk derinliğine dair değerlendirmenin tersinir veya tersinmez etkileri ayırt etmekte kullanılabileceği ileri sürülmektedir (16). Son olarak, ICE gözün maruz kalmasıyla ilgili sistemik toksisite potansiyelinin değerlendirilmesine olanak tanımamaktadır.

9. ICE'nin aşırı olmayan tahriş ediciler ile tahriş edici olmayan maddelerin teşhisinde yararları ve sınırları hakkında tespit çalışmaları halen sürmektedir (ayrıca bkz. paragraf 48). ICE test yönteminin aşırı olmayan tahriş ediciler ile tahriş edici olmayan maddelerin teşhisi dahil olmak üzere gelecekteki olası kullanımlarının tam değerlendirmesi için kullanıcıların numuneleri ve/veya bulguları değerlendirme kuruluşlarına göndermeleri önerilmektedir.

10. Bu deneyi ilk defa gerçekleştirecek laboratuarlarda Ek-II'de belirtilen test yeterlik referans kimyasallarının kullanılması gerekmektedir. Laboratuvarlar ICE deneyi verilerini mevzuata göre zararlılık sınıflandırmasını için sunmadan önce bu kimyasalları kullanarak ICE test yöntemini kullanabilme yeterliklerini ortaya koyabilirler.

TEST YÖNTEMİNİN İLKESİ

11. ICE test yöntemi tavuk gözünü kısa vadeli olarak in vitromuhafaza eden organotipik bir modeldir. Bu test yönteminde test materyalinin yol açtığı hasar kornea şişmesinin, opaklığının ve floresintutunumunun ölçülmesi sonucunda belirlenir. Kornea şişmesi nicel değerlendirme gerektirirken diğer parametrelerde nitel değerlendirme sözkonusudur. Her ölçümden elde edilen değerler toplam Tahriş Edicilik Endeksinin hesaplanması için nicel bir puana çevrilecek veya test materyalinin in vitrooküler tahriş olma ve aşırı tahriş edicilik sınıflandırma kategorisini belirlemekte nitel değerlendirme verisi olarak kullanılacaktır. Her iki sonuç da sonradan test materyalinin in vivooküler tahriş olma ve aşırı tahriş edicilik sınıflandırma kategorisini belirlemekte kullanılabilir (bkz. Sonuç kriterleri).

Tavuk Gözlerinin Kaynağı ve Yaşı

12. Mezbahalara gönderilen tavuklar insanlar tarafından tüketilmek veya diğer ticari amaçlarla öldürülmektedir. Deneyde yalnızca insan besin zincirinde yer almaya uygun sağlıklı hayvanların korneaları kullanılacaktır.

13. Optimum tavuk yaşı konusunda kontrollü bir çalışma yürütülmemiş olsa da bugüne kadar test yönteminde kullanılan tavuk yaşı ve ağırlığına göre mezbahalarda işlenen piliçler (yaklaşık 7 haftalık 1,5-2,5 kg) kullanılmaktadır.

Gözlerin Toplanması ve Laboratuvara Taşınması

14. Kafalar tavukların bayıltılmasından (genellikle elektrik şokuyla) ve boynun kesilmesinden hemen sonra gövdeden ayrılmalıdır. Laboratuvara yakın yerel bir tavuk kaynağı belirlenecek ve kafalar mezbahadan laboratuvara bozulmayı ve/veya bakteri kirlenmesini en aza indirecek hızda taşınacaktır. Kafaların toplanması ve gözlerin deneyde kullanılması arasındaki zaman aralığı en aza indirilmeli (genellikle iki saat içinde) ve deney sonuçlarına olası etkisi yönünden belirtilmelidir. Bu sonuçlar pozitif ve negatif kontrol tepkilerinin yanı sıra göz seçme kriterleriyle de belirlenmektedir. Deneyde kullanılan gözlerin tamamı belli bir günde toplanmış aynı grup gözlerden olacaktır.

15. Gözler laboratuvarda çıkarılacağı için tüm haldeki kafaların mezbahadan laboratuvara ortam sıcaklığında, izotoniksalinle ıslatılmış havlularla nemlendirilen plastik kutularda taşınması gerekmektedir.

ICE Deneyinde Kullanılacak Gözler İçin Seçme Kriterleri

16. Çıkartıldıklarında yüksek taban floresin renklenmesi (>0,5) veya kornea opaklığı puanı (>0,5) bulunan gözler kullanılmayacaktır.

17. Her işlem grubunda ve eşzamanlı pozitif kontrolde en az üç göz bulunacaktır. Negatif kontrol grubu veya çözücü kontrolünde (salin dışında bir çözücü kullanılıyorsa) en az bir göz bulunacaktır.

İŞLEM

Gözlerin Hazırlanması

18. Göz kapakları korneaya zarar verilmeksizin dikkatle kesilecektir. Kornea bütünlüğü kornea yüzeyine birkaç saniyeliğine % 2 (ağırlık/hacim) sodyum floresin damlatılmak ve daha sonra izotoniksalinle yıkanmak suretiyle hemen test edilir. Floresin işleminden geçen gözler yarık lamba mikroskobu ile incelenerek korneanın hasar görmüş (floresintutunumu ve korneaopaklık puanı < 0,5) olup olmadığı saptanır.

19. Hasar yoksa gözler korneaya zarar verilmeksizin dikkatle kafatasından çıkarılır. Göz küresi cerrahi forsepsle niktitant zardan sıkıca tutularak göz çukurundan çekilir ve göz kasları kıvrımlı, kör uçlu makasla kesilir. Fazla basınç uygulayarak kornea hasarı (bası eseri) oluşturmamak gereklidir.

20. Göz çukurundan çıkarılırken optik sinirin görünür bir parçası üzerinde bırakılmalıdır. Çukurdan çıkarıldıktan sonra göz emici ped üzerine yerleştirilmeli ve niktitantmembran ile diğer bağ dokuları kesilmelidir.

21. Çıkartılmış göz kornea dikey gelecek şekilde paslanmaz çelik bir kıskaca yerleştirilecektir. Kıskaç daha sonra damlatma cihazının bir odacığına aktarılır (16). Kıskaç bütün korneaya izotoniksalin damlatılabilecek şekilde yerleştirilmelidir. Damlatma cihazı odacık sıcaklığı 32 ± 1,5 °C olarak tutulmalıdır. Ticari olarak edinilebilecek ya da imal edilebilecek damlatma cihazı ile göz kıskaçlarının çizimi Ek-III'te yer almaktadır. Cihaz,laboratuvarın özel ihtiyaçları karşılamak, örneğin daha farklı sayıda göz yerleştirebilmek için yeniden düzenlenebilir.

22. Damlatma cihazına yerleştirildikten sonra gözler yarık lamba mikroskopla incelenerek kesme işlemi sırasında hasar görüp görmediklerine bakılacaktır. Bu sırada kornea kalınlığı da yarık lamba mikroskop üzerindeki derinlik ölçme cihazıyla kornea apeksinden ölçülecektir. (i) Floresin tutunum puanı > 0,5 olan, (ii) korneaopaklığı> 0,5 olan ya da (iii) diğer hasar özellikleri gösteren gözler değiştirilecektir. Bu kriterlerle dışarıda bırakılmayan gözlerden kornea kalınlığı gözlerin toplamının ortalama değerinden % 10'dan fazla sapma gösterenler de kullanılmayacaktır. Kullanıcılar yarık genişliği ayarlarının yarık lamba mikroskopta farklı kornea kalınlık ölçümlerine yol açabileceğini akılda tutmalıdır. Yarık genişliği 0,095 mm'ye ayarlanmalıdır.

23. Gözler hepsi incelendikten ve onaylandıktan sonra dozaj öncesi test sitemine denkleştirmek için 45 ila 60 dakika boyunca inkübe edilir. Denkleştirme süresi sonunda, taban değer olarak kullanılmak üzere kornea kalınlığı ve opaklığı için sıfır referans değeri (zaman = 0) kaydedilir. Kesim sırasındaki floresin puanı, sonlanma noktası için taban ölçümü görevi görür.

Test Materyalinin Tatbiki

24. Sıfır referans ölçümünün hemen ardından tutucudaki gözler damlatma cihazından çıkarılır, yatay konumda yerleştirilir ve test materyali korneaya tatbik edilir.

25. Sıvı test materyalleri genellikle seyreltilmeden tatbik edilir ama gerekli görülen hallerde (örneğin çalışma tasarımı gereği) seyreltilebilir. Seyreltilmiş maddeler için tercih edilen çözücü fizyolojik salindir. Ancak kontrollü koşullarda alternatif çözücüler kullanılabilir. Bu durumda fizyolojik salin dışındaki çözücülerin uygunluğu ortaya konulmalıdır.

26. Sıvı test materyalleri korneaya bütün yüzeyi eşit biçimde kaplayacak şekilde ve 0,03 ml standart hacimle tatbik edilir.

27. Mümkünse katı maddeler havanla veya benzer bir gereçle öğütülmelidir. Toz korneaya bütün yüzeyi eşit biçimde kaplayacak şekilde tatbik edilir. Standart miktar 0,03 gramdır.

28. Sıvı veya katı test materyali 10 saniye tatbik edildikten sonra göz oda sıcaklığında izotonik salinle (yaklaşık 20 ml) yıkanarak temizlenir. Ardından, tutucudaki göz damlatma cihazındaki dikey konumuna tekrar yerleştirilir.

Kontrol Maddeleri

29. Her deneyde eşzamanlı negatif veya çözücü/taşıyıcı kontrolleri ve pozitif kontroller kullanılmalıdır.

30. % 100 homojen sıvılar veya katı maddeler test edilirken fizyolojik salin ICE test yönteminde eşzamanlı negatif kontrol olarak kullanılarak test sistemindeki deneye özgü olmayan değişimler teşhis edilir ve deney koşullarının hatalı tahriş edici tepkisine yol açmaması güvence altına alınır.

31. Seyreltilmiş sıvılar test edilirken eşzamanlı bir çözücü/taşıyıcı kontrol grubu kullanılarak ve test sistemindeki deneye özgü olmayan değişimler teşhis edilir ve deney koşullarının hatalı tahriş edici tepkisine yol açmaması güvence altına alınır. Paragraf 25'te belirtildiği üzere yalnızca test sistemi üzerinde olumsuz etkileri olmayan çözücüler/taşıyıcılar kullanılabilir.

32. Uygun bir tepki oluştuğunu doğrulamak için her deneyde eşzamanlı pozitif kontrole bilinen bir oküler tahriş edici dahil edilir. ICE deneyi bu test yönteminde aşındırıcı veya aşırı tahriş edici maddeleri teşhis etmek için kullanıldığından pozitif kontrol bu test yönteminde aşırı tepkiye yol açan bir referans madde olmalıdır. Ancak pozitif kontrol tepkisinde zaman içinde değişimleri değerlendirebilmek için aşırı tepki çok ileri düzeyde olmamalıdır. Pozitif kontrol hakkında yeterli in vitroveriler elde edilerek pozitif kontrol için kabul edilebilir aralık istatistiksel olarak tanımlanmalıdır. Geçmişten gelen uygun ICE test yöntemi verileri belli bir pozitif kontrol için mevcut değilse bu bilgiyi elde etmek için çalışmalar yürütülmesi gerekebilir.

33. Sıvı test materyalleri için pozitif kontrol örnekleri % 10 asetik asit veya % 5 benzalkonyumklorür'dür. Katı test materyalleri için pozitif kontrol örnekleri ise sodyum hidroksit veya imidazol'dür.

34. Belirli kimyasal veya ürün sınıfından olup bilinmeyen kimyasalların oküler tahriş edicilik potansiyelini veya belli bir tahriş edici tepki aralığındaki oküler tahriş edicilerin göreceli tahriş edicilik potansiyelini değerlendirirken referans maddelerin kullanılması yararlı olacaktır.

Sonlanma noktası ölçümleri

35. Kornealar işlem öncesinde ve işlem sonrası yıkamadan 30, 75, 120, 180 ve 240 dakika (± 5 dakika) sonra değerlendirilirler. Bu zaman noktaları dört saatlik işlem süresince uygun sayıda ölçüm yapılmasını ve gerekli gözlemleri bütün gözlerde gerçekleştirecek süreyi sağlar.

36. Yapılacak sonlanma noktası değerlendirmeleri korneaopaklığı, şişme, floresintutunumu ve morfolojik etkilerdir (örneğin epitelin çökmesi veya gevşemesi). Floresin tutunumu dışında bütün sonlanma noktası ölçümleri yukarıda belirtilen zaman noktalarında yapılır. Floresin tutunumunun değerlendirmesi ise yalnızca işlem öncesinde ve test materyalinin tatbik edilmesinden 30 dakika sonra yapılır.

37. Korneaopaklığı, floresintutunumu ve morfolojik etkileri belgelemek için fotoğraflar çekilmesi ve yapılmışsa histopatoloji sonuçlarının elde edilmesi önerilir.

38. Dört saat içindeki son incelemenin ardından olası histopatolojik inceleme için gözlerin uygun bir fiksasyon (örneğin nötr tamponlu formalin) içinde muhafaza edilmesi önerilir.

39. Kornea şişmesi, yarık lamba mikroskop üzerindeki optik pakimetre ile yapılan kornea kalınlığı ölçümüyle belirlenir ve aşağıdaki formülle hesaplanan yüzde şeklinde ifade edilir:

$$\frac{\{\text{kornea kalınlığı}(\text{zaman} = t) - \text{kornea kalınlığı}\ (\text{zaman} = 0)\}}{\text{kornea kalınlığı}\ (\text{zaman} = 0)} \times 100$$

40. Gözlerin tamamındaki kornea şişmesi tüm gözlem zamanlarında ölçülerek ortalama yüzde hesaplanır. Her test materyaline herhangi bir zaman noktasında gözlemlenen en yüksek ortalama kornea şişme puanından yola çıkılarak toplam kategori puanı verilir.

41. Kornea opaklığı, korneanın en yoğun opaklık puanı olan bölgesi üzerinden hesaplanır. Gözlerin tamamındaki kornea opaklığı tüm gözlem zamanlarında ölçülerek ortalama korneaopaklığı değeri hesaplanır. Her test materyaline herhangi bir zaman noktasında gözlemlenen en yüksek ortalama korneaopaklığı puanından yola çıkılarak toplam kategori puanı verilir (Tablo 1).

Tablo 1.Kornea opaklığı puanları

Puan	Gözlem
0	Opaklık yok
0,5	Çok silik opaklık
1	Dağınık bölgelerde, irisin ayrıntıları açıkça görülüyor
2	Kolayca fark edilen mat bölge, irisin ayrıntıları biraz belirsizleşmiş
3	Aşırı korneaopaklığı, irisin ayrıntıları seçilemiyor, pupilanın boyu zor fark ediliyor
4	Tam korneaopaklığı, iris görünmüyor

42. Gözlerin tamamının ortalama floresin tutunum değeri yalnızca 30 dakika gözlem zamanı üzerinden hesaplanır ve her test maddesine toplam kategori puanı verilmesinde kullanılır. (Tablo2)

Tablo 2.Floresin tutunum puanları

Puan	Gözlem
0	Floresintutunumu yok
0,5	Tek hücrede çok az renk değişikliği var
1	Tek hücredeki renk değişikliği korneanın işlem gören kısmına yayılmış
2	Odak veya karışık yoğun tek hücre renk değişikliği var.
3	Korneanın geniş kısımlarında birleşen floresintutunumu var

43. Morfolojk etkiler kornea epitel hücrelerinin "çökmesi", epitelin "gevşemesi", kornea yüzeyinin "pürüzlenmesi" ve test materyalinin korneaya "yapışmasıdır". Bulgular çeşitli ağırlık derecelerinde olabilir ve aynı zamanda da görülebilirler. Morfolojik etki bulgularının sınıflandırılması araştırmacının yorumuna bağlıdır.

VERİLER VE RAPORLAMA

Verilerin Değerlendirilmesi

44. Kornea opaklığı, şişme ve floresintutunumu ayrı ayrı değerlendirilerek her sonlanma noktası hesaplaması için ICE sınıfı elde edilir. Elde edilen ICE sınıfları birleştirilerek her test materyali için Tahriş Edicilik Sınıflandırması ortaya konulur.

Karar Kriterleri

45. Her sonlanma noktası değerlendirmesi yapıldıktan sonra önceden belirlenmiş aralığa göre ICE sınıflarına dağıtma yapılabilir. Dört ICE sınıfında kornea kalınlığı (Tablo 3), opaklık (Tablo 4) ve floresin tutunumu(Tablo 5) için aşağıdaki ölçekler kullanılır:

Tablo 3
ICE kornea kalınlığı sınıflandırma kriterleri

Korneadaki Ortalama Şişme (%) (*)	ICE Sınıfı
0 ila 5	I
> 5 ila 12	II
>12ilal8(işlemden >75 dakika sonra)	II
>12 ila l8(işlemden <75 dakika sonra)	III
> 18 ila 26	III
> 26 ila 32 (işlemden > 75 dakika sonra)	III
> 26 ila 32 (işlemden < 75 dakika sonra)	IV
> 32	IV

(*) Korneadaki şişme puanları sadece kalınlık No I derinlik ölçüm cihazlı, yarık genişliği 0,095 mm'ye eşit $9^{1/2}$düzeyinde ayarlanmış Haag-Streit BP900 yarık lamba mikroskobu ile ölçülmüşse geçerli sayılır. Kullanıcılar yarık genişliği ayarlarının yarık lamba mikroskopta farklı kornea kalınlık ölçümlerine yol açabileceğini göz önünde bulundurmalıdırlar.

Tablo 4 .ICEopaklık sınıflandırma kriterleri

Ortalama Maksimum Opaklık Puanı (*)	ICE Sınıfı
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Bkz. Tablo 1

Tablo 5. Ortalama floresintutunumu ICE sınıflandırması

İşlemden 30 dakika sonra Ortalama Floresin Tutunum Puanı (*)	ICE Sınıfı
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Bkz. **Tablo 2.**

46. Test materyalinin toplam *in vitro* tahriş edicilik sınıflandırması korneadaki şişme, korneadaki opaklık ve flöresin tutunumuna ilişkin belirlenen sınıfların kombinasyonuna tekabül eden tahriş edicilik sınıfı alınarak ve Tablo 6'daki şema uygulanarak değerlendirilir.

Tablo 6. Toplam in vitro tahriş edicilik sınıflandırması

Sınıflandırma	Üç sonlanma noktası değerlendirmesinin kombinasyonu
Aşındırıcı/Aşırı tahriş edici	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II (*) 2 x IV, 1 x I (*) Korneaopaklığı> 30 dakikada 3 (en az 2 gözde) Kornea opaklığı = herhangi bir zaman noktasında 4 (en az 2 gözde) Aşırı epitel gevşemesi (en az 1 gözde)

(*) Kombinasyon olasılığı düşüktür.

47. Paragraf 1'de belirtildiği üzere, test materyali oküler aşındırıcı veya aşırı tahriş edici olarak tanımlanmazsa sınıflandırma ve etiketleme için ek testler yapılması gerekir. ICE test yöntemi EPA (1), AB (2) veya GHS (3) sınıflandırma sistemlerine göre sınıflandırılmış toplamda % 83 (120/144) ila % 87 (134/154) kesinliğe sahip olup, *in vivo*tavşan gözü test yöntemi verileriyle karşılaştırıldığında hatalı pozitif oran % 6 (7/122) ila % 8 (9/116) ve hatalı negatif oran % 41 (13/32) ila % 50 (15/30) düzeyindedir. Belirli kimyasal (alkoller, yüzey aktif maddeler) veya fiziksel (katı maddeler) kategorilerden maddeler veritabanından çıkarıldığında AB, EPA ve GHS sınıflandırma sistemlerine göre ICE kesinliği % 91 (75/82) ila % 92 (69/75), hatalı pozitif oranlar % 5 (4/73) ila % 6 (4/70) ve hatalı negatif oranlar % 29 (2/7) ila % 33 (3/9) düzeyinde gerçekleşmektedir (4).
48. Test materyalinin oküler aşındırıcı veya aşırı tahriş edici olarak sınıflanmaması durumunda dahi ICE verileri *in vivo*tavşan gözü testinden veya doğrulanmış bir *in vitro* testten elde edilen verilerle birlikte ICE test yönteminin aşırı olmayan tahriş ediciler ile tahriş edici olmayan maddelerin teşhisinde kullanışlılığı ve sınırlarının daha iyi değerlendirilmesine yardımcı olabilir.

Çalışma Kabul Kriterleri

49. Eşzamanlı negatif veya taşıyıcı/çözücü kontrolleri ile eşzamanlı pozitif kontroller tahriş edici olmayan madde ve aşırı tahriş edici/aşındırıcı sınıflarında Tahriş Edicilik Sınıflandırmasına tekabül ediyorsa kabul edilebilir sayılır.

Test Raporu

50. Test raporu çalışmanın yürütülmesine göre aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test ve Kontrol Maddeleri
Kimyasal Kuramlar Servisi (ChemicalAbstracts Service - CAS) tarafından kullanılan ad ve biliniyorsa, ardından diğer isimler,
Biliniyorsa CAS Numarası,
Biliniyorsa maddenin veya karışımın (ağırlık yüzdesi olarak) aralığı ve bileşimi,
Çalışmanın yürütülmesiyle ilgili olarak fiziksel durum, uçuculuk, pH, sabitlik, kimyasal grubu, su çözünürlüğü gibi fiziksel ve kimyasal özellikler,
Uygulanıyorsa, test/kontrol maddeleri üzerinde test öncesinde yapılan ısıtma, öğütme gibi işlemler,
Biliniyorsa sabitlik.

Sponsor ve Test Yeri İle İlgili Bilgiler
Sponsorun, test yerinin ve çalışma yöneticisinin adları ve adresleri,
Gözlerin alındığı kaynak (toplandıkları tesis),
Gözlerin depolanma ve taşınma koşulları (toplanma günü ve saati, teste başlamadan önce geçen süre, taşıma araçları ve sıcaklığı, kullanılan antibiyotikler gibi),
Biliniyorsa gözleri toplanan hayvanların özellikleri (donör hayvanın yaşı, cinsiyeti, ağırlığı gibi).

Test Yöntemi ve Protokolün Kullanılma Gerekçeleri
Test Yöntemi Bütünlüğü
Test yönteminin bütünlüğünü (kesinliğini ve güvenilirliğini) süreç boyunca korumaya yönelik işlemler (yeterlik maddelerinin periyodik testleri, geçmiş negatif ve pozitif kontrol verilerinin kullanılması gibi).

Testin Kabul Edilebilirlik Kriterleri
Uygulanabiliyorsa geçmiş verilere dayanan eşzamanlı referans kontrol aralıkları.

Test Koşulları
Kullanılan test sisteminin tanımlanması,
Kullanılan yarık lamba mikroskop modeli,
Kullanılan yarık lamba mikroskobun ayar bilgileri,
Kullanılan tavuk gözlerinin vasıfları ve diğer bilgiler,
Kullanılan test prosedürüne ilişkin bilgiler,
Kullanılan test materyali konsantrasyonu,
Test prosedüründe herhangi bir değişiklik yapılmışsa tanımlanması,
Modelin geçmiş verilerine (negatif ve pozitif kontroller, yeterlik maddeleri, referans maddeler gibi) atıflar,
Kullanılan değerlendirme kriterlerinin tanımlanması.

Sonuçlar
Gözlemlenen diğer etkilerin tanımlanması,
Mevcutsa gözlerin fotoğrafları.

Sonuçların Tartışılması
Sonuç

KAYNAKLAR

(1) U.S. EPA (1996). LabelReview Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
(2) Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. OJ L 353, 31.12.2008, p. 1.
(3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]
(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report –InVitroOcularToxicityTest 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 forthe Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
(5) ESAC (2007). Statement on theconclusion of the ICCVAM retrospectivestudy on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eyeirritants. Available:[http://ecvam.jrc.it/index.htm]
(6) Regulation (EC) No 1907/2006 of theEuropean Parliament and of theCouncil of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of

Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ L 396, 30.12.2006, p. 1.
(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Available:
[http://www.oecd.org/document/40/0, 2340, en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]
(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report –In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center fot he Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
(9) ICCVAM. (2006). Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]
(10) Prinsen, M.K. andKoëter, 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: Chickenenucleatedeye test (CEET). Available:
[http://ecvam.jrc.it/index.htm]
(12) Balls, M.,Botham, P.A., Bruner, L.H. andSpielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test.Toxicol. In Vitro9:871-929.
(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosionpotential of test materials. FoodChem. 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.FoodChem. Toxicol.35:23-37.
(15) Siegel, J.D.,Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., andthe Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Available:
[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].
(16) Maurer, J.K.,Parker, R.D. andJester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: keyfindings and recommendations for the development of alternativeassays.Reg. Tox. Pharmacol.36:106-117.
(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The in vitro assessment of severe irritants.Fd. Cosmet.- Toxicol.- 19, 471-480.
(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]
(19) ICCVAM (2006). Background reviewdocument, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Available:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

TANIMLAR

Doğruluk: Test yöntemi sonuçları ile kabul edilen referans değerler arasındaki uyuşma düzeyi.Test yöntemi performansını ölçmek için kullanılır ve 'bağıntılılık' kavramının bir yönüdür. Bu terim sık sık 'uyum' kavramıyla karşılanarak test yönteminden kaynaklanan doğru sonuçlar anlamında kullanılır.

Referans madde: Test maddesi ile karşılaştırmada standart olarak kullanılan madde. Referans maddenin şu özellikleri taşıması gerekir: (i) Sürekli ve güvenilir kaynaklar, (ii) Test konusu maddeler sınıfıyla yapısal ve işlevsel benzerlik, (iii) Bilinen fiziksel/kimyasal özellikler, (iv) Bilinen etkiler hakkında destekleyici veriler ve (v) İstenen tepki aralıksında bilinen kuvvet.

Kornea: Göz küresinin önünde yer alan ve iris ile pupillayı kaplayarak içeriye ışık ileten saydam kısım.

Korneaopaklığı: Test materyali tatbik edildikten sonra korneada ölçülen opaklık düzeyi. Artankorneaopaklığı korneanın hasar gördüğünü gösterir. Opaklık, Draize tavşan gözü testinde olduğu gibi öznel olarak veya opaklık ölçer gibi bir cihazla nesnel olarak değerlendirilebilir.

Kornea şişmesi: ICE testinin kornea test materyaline maruz bırakıldıktan sonra şişme derecesini belirleyen nesnel bir ölçümdür. Taban (dozaj öncesi) kornea kalınlığı ölçümleri ile test materyaline maruz kalma sonrasında düzenli aralıklarla kaydedilen kalınlıklar üzerinden hesaplanır ve yüzde olarak ifade edilir. Kornea şişmesinin derecesi kornea hasarını gösterir.

EPA Kategorisi 1: 21 günden daha fazla süren aşındırıcı (göz dokusunda kalıcı hasar) veya kornea etki ya da tahriş olma (1).

AB Kategorisi R41: Test materyalinin gözün dış yüzeyine tatbikinden sonra ortaya çıkan ve uygulamadan sonra 21 gün içinde tam olarak düzelmeyen doku hasarı veya ciddi görme bozukluğu(2).

Yanlış negatif oran: Test yöntemi tarafından yanlış olarak negatif teşhis edilen bütünpozitif maddelerin oranı. Test yöntemi performansının göstergelerinden birisidir.

Yanlış pozitif oran: Test yöntemi tarafından yanlış olarak pozitif teşhis edilen bütünnegatif maddelerin oranı. Test yöntemi performansının göstergelerinden birisidir.

Floresin tutunumu: ICE testinde korneanın test materyaline maruz kalmasının ardından epitel hücrelerinde biriken floresin sodyum miktarına ilişkin öznel bir ölçümdür. Floresintutunumu derecesi kornea epitelindeki hasarı gösterir

.

GHS (Kimyasalların Sınıflandırılması ve Etiketlenmesinde Küresel Uyumlaştırma Sistemi): Kimyasalları (maddeler ve karışımlar) standart tip ve fiziksel, sağlık ve çevresel zararlılık düzeylerine göre sınıflandıran, zararlılık işaretleri, uyarı kelimeleri, zararlılık ifadeleri, önlem ifadeleri ve güvenlik bilgi formları gibi iletişim araçlarla insanlar (çalışanlar,

taşımacılar, tüketiciler, acil yardım personeli gibi) ve çevre üzerinde olumsuz etkileri hakkında bilginin iletimini sağlayan sistem(3).

GHS Kategorisi1: Test materyalinin gözün dış yüzeyine tatbikinden sonra ortaya çıkan ve uygulamadan sonra 21 gün içinde tam olarak düzelmeyen doku hasarı veya ciddi görme bozukluğu(3).

Tehlike: Bir maddenin veya bu maddeye maruz kalma durumunun maruz kalan sistem veya (alt) popülasyon üzerinde olumsuz etkide bulunma potansiyeli.

***In Vitro*Tahriş Edicilik Puanı (IVIS):** BCOP deneyinde her uygulama grubunun ortalama opaklık ve ortalama geçirgenlik değerlerinin her grup için tek bir *in vitro*puan olarak birleştirildiği ampirik formül. *IVIS* = ortalama opaklık değeri + (15 *ortalama geçirgenlik değeri).

Negatif kontrol: Test sisteminin bütün bileşenlerini içeren işlemsiz tekrar. Bu numune test materyali tatbik edilmiş numunelerle ve diğer kontrol numuneleri ile işlenerek çözücünün test sistemiyle etkileşim içinde olup olmadığı saptanır.

Tahriş edici olmayan madde: EPA Kategorisi I, II veya III; AB Kategorisi R41 ve R36; veya GHS Kategorisi 1, 2A, veya 2B oküler tahriş ediciler kapsamında olmayan maddeler.

Oküler aşındırıcı: (a) Göz dokusunda kalıcı hasara yol açan maddeler, (b) GHS Kategorisi 1, EPA Kategorisi I veya AB Kategorisi R41 oküler tahriş ediciler kapsamında yer alan maddeler (1) (2) (3).

Oküler tahriş edici: (a) Gözün dış yüzeyine tatbik edilmesinin ardından göz üzerinde tersinir değişime yol açan maddeler, (b) EPA Kategorisi II veya III, AB Kategorisi R36 ya da GHS Kategorisi 2A veya 2B oküler tahriş ediciler kapsamında yer alan maddeler (1) (2) (3).

Oküler aşırı tahriş edici: (a) Gözün dış yüzeyine tatbik edilmesinin ardından 21 gün içinde düzelmeyen doku hasarına yada ciddi görme kaybına yol açan maddeler, (b) GHS Kategorisi 1, EPA Kategorisi I ya da AB Kategorisi R41 oküler tahriş ediciler kapsamında yer alan maddeler (1) (2) (3).

Opaklık ölçer: 'Korneaopaklığını" korneadan geçen ışığı değerlendirerek ölçen cihaz. Tipik cihazın iki kısmı bulunmakta olup her biri kendi ışık kaynağına ve fotoseline sahiptir. Kısımlardan biri işlemden geçirilmiş kornea için kullanılırken diğeri cihazın kalibrasyonu ve sıfırlaması için kullanılır. Halojen lamba ışığı kontrol kısmından (pencere ve sıvı bulunmayan boş odacık) fotosele gönderilir ve korneanın bulunduğu odacığı içeren deney kısmından fotosele gönderilen ışıkla karşılaştırılır. Fotosellerden ışık iletimindeki fark karşılaştırılır ve sayısal opaklık değeri dijital ekranda gösterilir.

Pozitif kontrol: Test sisteminin bütün bileşenlerini içeren ve pozitif tepki doğuracağı bilinen bir maddeyle işlem yapılan tekrar. Pozitif kontrol tepkisindeki değişkenliğin süreç boyunca değerlendirilebilmesi için aşırı tepkinin boyutu çok ileri düzeyde olmamalıdır.

Güvenilirlik: Farklı zamanlarda aynı laboratuvarda ve farklı laboratuvarlarda aynı protokol kullanıldığında test yöntemindeki ölçümlerin yeniden üretilebilirlik düzeyi. Laboratuvar

içinde ve laboratuvarlar arasında yeniden üretilebilirlik ile laboratuvar içinde tekrar edilebilirlik hesaplanarak değerlendirilir.

Yarık lamba mikroskop: Binoküler mikroskopla büyüterek stereoskopik, dik görüntü elde edilen ve gözün doğrudan incelendiği bir alettir.ICE test yönteminde bu alet tavuk gözünün iç yapılarını gözlemlemek ve ekli derinlik ölçücü cihazla kornea kalınlığını nesnel olarak ölçmek amacıyla kullanılır.

Çözücü/taşıyıcı kontrolü: Test sistemindeki test materyali tatbik edilmiş çözücü veya taşıyıcı dahil bütün bileşenleri ve diğer kontrol numunelerini içeren aynı çözücü veya taşıyıcıda çözünen test materyali tatbik edilmiş numuneler için taban tepki tespit etmeyi amaçlayan işlenmemiş numune. Bu numune eşzamanlınegatif kontrolle test edildiği zaman ayrıca çözücü veya taşıyıcının test sistemiyle etkileşime girip girmediğini de gösterir.

Aşamalı test: Test materyali hakkındaki mevcut bütün bilgilerin belirlenen sırayla gözden geçirildiği aşamalı bir test stratejisidir. Her bir sırada, sonraki sıraya geçmeden önce kanıt ağırlığı yaklaşımıyla tehlike sınıflandırması sonucuna ulaşılabilecek yeterli bilgi bulunup bulunmadığı kararlaştırılır. Test materyalinin tahriş edicilik potansiyeli mevcut bilgilere göre belirlenebiliyorsa ek testlere gerek duyulmaz. Test maddesinin tahriş edicilik potansiyeli mevcut bilgilere göre belirlenemiyorsa kesin sınıflandırma olanaklı hale gelinceye kadar ardışık hayvan testleri yapılır.

Doğrulanmış test yöntemi: Belirli bir amaca ilişkin bağıntılılık (doğrulukla birlikte) ve güvenilirlik değerlendirmesi için doğrulama çalışmalarının tamamlanmış olduğu testyöntemi. Doğrulanmış test yönteminin belirli amaç yönünden doğruluk ve güvenilirlik değerlendirmesinde yeterli performans gösteremeyebileceğini belirtmek gerekir.

Kanıt ağırlığı: Maddenin tehlike potansiyeline ilişkin sonuca ulaşmak ve bu sonucu desteklemek için çeşitli verilerin yeterli ve yetersiz yönlerinin değerlendirilmesi süreci.

Ek-II

ICE test yöntemi için yeterlik maddeleri

Bu test yöntemine ilişkin rutin kullanım öncesinde laboratuvarlar Tablo 1'de önerilen oküler aşındırıcılık sınıflandırmasını doğru yapabilmek konusunda teknik yeterliliklerini ortaya koyabilirler. Sözkonusu maddeler lokal göz tahriş olma/korozyonuna dair *in vivo*tavşan gözü testinden elde edilen tepkiler aralığını yansıtacak şekilde belirlenmiştir (TG 405) (örneğin 1, 2A, 2B veya BM GHS'ye göre sınıflandırılmamış ve etiketlenmemiş (3) (7)). Ancak, bu deneylerin doğrulanmış yararları gözönünde bulundurulduğunda (yalnızca oküler aşındırıcıların/aşırı tahriş edicilerin teşhisi yönünden), sınıflandırma yönünden (aşındırıcı/aşırı tahriş edici veya aşındırıcı/aşırı tahriş edici olmayan maddeler) yeterliği gösterebilecek sadece iki test sonucu mevcuttur. Diğer seçme kriterleri maddelerin ticari yolla edinilebilir olması, yüksek kalitede *in vivo*referans verilerin mevcut olması ve Test Talimatnamesinin oluşturulduğu iki *in vitro*yönteme ilişkin yüksek kaliteli veriler bulunmasıdır. Bu nedenle yeterlik maddelerinin ICCVAM tarafından *in vitro*oküler toksisite testi yöntemlerinin doğrulanması için önerilen 122 referans madde listesinden seçilmesi gerekmektedir (bkz. Ek H: ICCVAM Önerilen Referans Maddeler Listesi) (5). Referans veriler Sığır korneası opaklığı ve geçirgenliği (BCOP) ve ICE test yöntemleri için ICCVAM Arka Plan Gözden Geçirme Belgelerinde mevcuttur (18) (19).

Tablo 1. ICE deneylerinde teknik yeterlik için önerilen maddeler

Madde	CAS No	Kimyasal grupları (1)	Fiziksel Hali	*In Vivo* Sınıflandırması (2)	*In Vitro* Sınıflandırması (3)
Benzalkonyumklorid (% 5)	8001-54-5	Onyum bileşiği	Sıvı	Kategori 1	Aşındırıcı/Aşırı tahriş edici
Klorheksidin	55-56-1	Amin, Amidin	Katı	Kategori 1	Aşındırıcı/Aşırı tahriş edici
Dibenzoil-L-tartarik asit	2743-38-6	Karboksilik asit, Ester	Katı	Kategori 1	Aşındırıcı/Aşırı tahriş edici
İmidazol	288-32-4	Heterosiklik	Katı	Kategori 1	Aşındırıcı/Aşırı tahriş edici
Trikloroasetik asit (% 30)	76-03-9	Karboksilik Asit	Sıvı	Kategori 1	Aşındırıcı/Aşırı tahriş edici
2,6-Diklorobenz-oil klorid	4659-45-4	Asil halid	Sıvı	Kategori 2A	Aşındırıcı/aşırı tahriş edici değil
Etil-2-metilaseto-asetat	609-14-3	Keton, Ester	Sıvı	Kategori 2B	Aşındırıcı/aşırı tahriş edici değil
Amonyum nitrat	6484-52-2	İnorganik tuz	Katı	Kategori 2A	Aşındırıcı/aşırı tahriş edici değil
Gliserol	56-81-5	Alkol	Sıvı	Etiketlenmemiş	Aşındırıcı/aşırı tahriş edici değil
n-Heksan	110-54-3	Hidrokarbon (asiklik)	Sıvı	Etiketlenmemiş	Aşındırıcı/aşırı tahriş edici değil

(1)Test materyallerine ilişkin kimyasal sınıflar National Library of MedicineMedicalSubjectHeadings (MeSH) sınıflama sistemine (http://www.nlm.nih.gov/mesh) göre oluşturulmuş standart sınıflandırma şeması uyarınca belirlenmiştir.

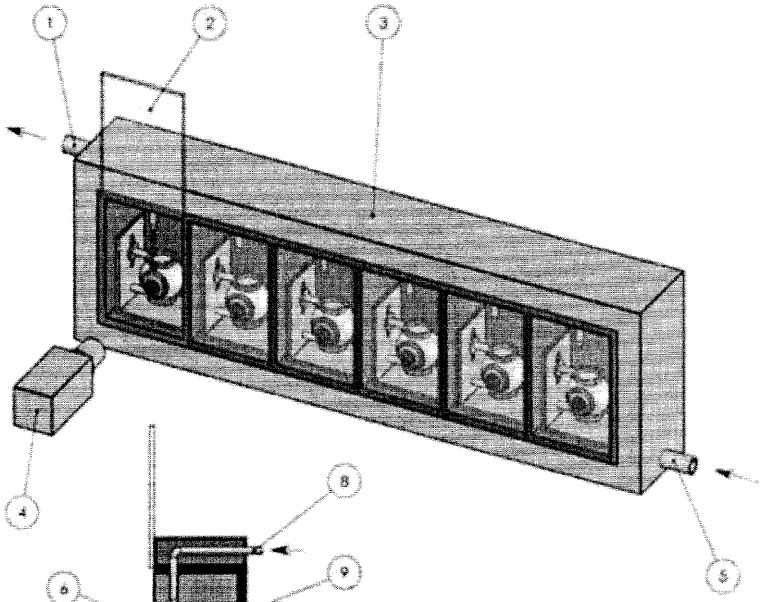
(2)In vivo tavşan gözü testi (OECD TG 405) sonuçlarına göre ve BM GHS (3)(7) kullanılarak oluşturulmuştur.

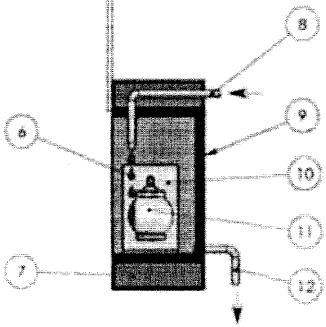
(3)BCOP ve ICE sonuçlarına göre oluşturulmuştur.

Ek-III

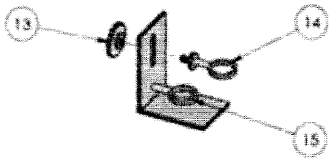
ICE damlatma cihazı ile göz kıskaçlarının çizimleri
(Damlatma cihazı ile göz kıskaçlarının ek nitelikleri için bkz. Burtonv.d. (17))

KISIM KESİTİ
GÖZ TUTUCU





Bölüm kesiti



Göz tutucu

NO.	TANIM
1	SICAK SU GİDERİ
2	SÜRME KAPI
3	DAMLATMA AYGITI
4	OPTİK ÖLÇÜM ALETİ
5	SICAK SU GİRİŞİ
6	SALİN ÇÖZELTİ
7	SICAK SU
8	SALİN ÇÖZELTİ GİRİŞİ
9	KISIM
10	GÖZ TUTUCU
11	TAVUK GÖZÜ
12	SALİN ÇÖZELTİ GİDERİ
13	TESPİT VİDASI
14	AYARLANABİLİR ÜST KOL
15	SABİT ALT KOL

BÖLÜM C

EKOTOKSİKOLOJİK VE ÇEVREYE ZARARLI ETKİLERİN TAYİNİ İÇİN YÖNTEMLER

C.1 BALIK İÇİN AKUT TOKSİSİTE

C.2 *DAPHNIA* SP. AKUT HAREKETSİZLEŞTİRME TESTİ

C.3 TATLI SU YOSUNLARI VE SİYANOBAKTERİ BÜYÜME ENGELLEME TESTİ

C.4 "KOLAY" BİYOBOZUNABİLİRLİK TESPİTİ

BÖLÜM I. GENEL DEĞERLENDİRMELER

BÖLÜM II. DOC DIE-AWAY (Kaybolum) TESTİ (Yöntem C.4-A)

BÖLÜM III. DEĞİŞTİRİLMİŞ OECD TARAMA TESTİ (Yöntem C.4-B)

BÖLÜM IV. CO_2 DEĞİŞİM TESTİ (Yöntem C.4-C)

BÖLÜM V. MANOMETRİK RESPİROMETRE TESTİ (Yöntem C.4-D)

BÖLÜM VI. KAPALI ŞİŞE TESTİ (Yöntem C.4-E)

BÖLÜM VII. M.I.T.I TESTİ (Yöntem C.4-F)

C.5 BOZUNMA- BİYOKİMYASAL OKSİJEN İHTİYACI

C.6 BOZUNMA- KİMYASAL OKSİJEN İHTİYACI

C.7 BOZUNMA- pH'NIN FONKSİYONU OLARAK ABİYOTİK BOZUNMA HİDROLİZİ

C.8 TOPRAK SOLUCANLARININ TOKSİSİTESİ

C.9 BİYOBOZUNMA - ZAHN-WELLENS TESTİ

C.10 BİYOBOZUNMA - AKTİF ÇAMUR BENZETİM TESTİ

C.11 BİYOBOZUNMA - AKTİF ÇAMUR SOLUNUM İNHİBİSYON TESTİ

C.12 BİYOBOZUNMA - DEĞİŞTİRİLMİŞ SCAS TESTİ

C.13 BİYOKONSANTRASYON - İÇ-AKIŞ BALIK TESTİ

C.14 YAVRU BALIK BÜYÜME TESTİ

C.15 BALIK, EMBRİYO ÜZERİNDE KISA DÖNEMLİ TOKSİSİTE VE YAVRU BALIK EVRELERİ

C.16 BAL ARILARI-AKUT ORAL TOKSİSİTE TESTİ

C.17 BAL ARILARI-AKUT TEMAS TOKSİSİTE TESTİ

C.18 KESİKLİ DENGE YÖNTEMİ KULLANARAK ADSORPSİYON/DESORPSİYON

C.19 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) KULLANARAK TOPRAKTA VE KANALİZASYON ÇAMURUNDA ADSORPSİYON KATSAYISI (Koc) HESAPLANMASI

C.20 *DAPHNIA MAGNA* ÜREME TESTİ

C.21 TOPRAK MİKROORGANİZMALARI: AZOT DÖNÜŞÜM TESTİ

C.22 TOPRAK MİKROORGANİZMALARI: KARBON DÖNÜŞÜM TESTİ

C.23 TOPRAK İÇİNDE AEROBİK VE ANAEROBİK DÖNÜŞÜM

C.24 SULU TORTU SİSTEMLERİNDE AEROBİK VE ANAEROBİK DÖNÜŞÜM

C.25 YÜZEY SULARINDA AEROBİK MİNERALİZASYON — BİYOBOZUNMA TESTİ SİMÜLASYONU

C.26 *LEMNA* SP. BÜYÜME YAVAŞLATMA TESTİ

C.1 BALIK İÇİN AKUT TOKSİSİTE

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu testin amacı temiz sulardaki balıklara geçebilecek maddelerin akut (ani) ölümcül toksisitesini belirlemektir. Test süresince test maddesikonsantrasyondeğerlerinin tatmin edici ölçüde sabit olmasını güvence altına almak için, en uygun test yönteminin (statik, yarı statik veya akıcı) seçilmesine yardımcı olmak amacıyla maddenin suda çözünürlüğü, buhar basıncı, kimyasal kararlılığı, bozunma sabitleri ve biyolojik olarak bozunabilirliği ile ilgili bilgilere mümkün olduğunca sahip olunması arzu edilir.

Testin planlanmasında ve elde edilen sonuçların yorumlanmasında ek bilgilerde (örneğin; yapısal formül, saflık derecesi, doğası ve belirli safsızlıkların yüzdesi, katkı maddeleri miktarları, n-oktanol/su dağılım katsayısı) göz önünde bulundurulmalıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Akut toksisite maddeye maruz kaldıktan çok kısa zaman sonra ortaya çıkan organizmadaki fark edilirolumsuz etkilerdir. Mevcut testte, akut toksisite ortanca ölümcül toksisite(LC_{50})şeklinde ifade edilmektedir. Bu konsantrasyon değeri maruz kalma süresi boyunca, su içinde yani test ortamında bulunan balıkların %50 sini öldürebilecek olan konsantrasyondur.

Tüm test maddelerin konsantrasyonları hacimde ağırlık cinsinden (Litre başına düşen miligram) verilmelidir. Bu konsantrasyonlar ağırlıktaki ağırlık (mg. kg^{-1}) cinsinden de verilebilir.

1.3. Referans maddeler

Laboratuar test koşulları altında test edilen türlerin tepkilerininbelirgin birşekilde değişmediğinin gösterilmesi anlamındareferans madde ile test yapılabilir.
Bu test için herhangi bir madde belirtilmemiştir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Litre başına 100 mg'da, LC_{50} 'nin bu konsantrasyondan daha büyük olduğunu göstermek için bir sınır testi yapılabilir.

Balıklar, çeşitli konsantrasyonlarda suya eklenen test maddesine 96 saat boyunca maruz bırakılır. Ölü sayıları en az 24 saat aralıklarla kaydedilir ve balıkların % 50 'sini öldüren konsantrasyon (LC_{50}) her bir gözlem zamanında hesaplanır(mümkünse).

1.5. Kalite kriterleri

Kalite ölçütü, hem tüm test yöntemine hem de kadar sınır testine uygulanmalıdır.
Kontrollerdeki ölü sayısı test sonu itibariyle % 10'u (veya, eğer 10'dan az balık kullanıldıysa, 1 balık) aşmamalıdır.

Çözünmüş oksijen konsantrasyonu, baştan sona kadar hava-doygunluk değerinin% 60 'ından daha fazla olmalıdır.

Test maddesi konsantrasyonları test süresi boyunca başlangıç konsantrasyonlarının %80'i oranındakorunmalıdır.
Test ortamında kolayca çözünenve kararlı çözeltiler oluşturan, örneğin belirgin miktarda buharlaşmayan, bozunmayan, hidroliz olmayan veya adsorplanmayan maddelerin başlangıç konsantrasyonları tanımlanmış (nominal) konsantrasyonlara eşitalınabilir.Konsantrasyonların, test boyunca korunduğunu ve kalite kriterinin sağlandığını gösteren kanıtlar sunulmalıdır.

Bu maddeler için:

(i) Test ortamında az çözünürlüğü olanlar, veya

(ii) Kararlı emülsüyon ve dağılım oluşturma yeteneğine sahip olanlar, veya

(iii) Sulu çözeltilerde kararlı olmayanlar,

Başlangıç konsantrasyonları testin başındaki çözeltide ölçülen(ya da bu teknik olarak mümkün değil ise, su kolonunda ölçülen) konsantrasyonları olarak alınmalıdır. Konsantrasyon, dengeleme periyodundan sonra ancak balık testinin başlangıcından önce belirlenmelidir.

Bu koşulların herhangi birinde, test süresince maruz kalınan gerçek konsantrasyonları ya da karşılaşılan kalite kriterini teyit etmek için ilave ölçümler yapılmalıdır.

pH bir birimden fazla değişmemelidir.

1.6. Test yöntemlerinin tanımlanması

Üç çeşit işlem kullanılabilir:

Statik test:
Test çözeltisi akışının meydana gelmediği toksisite testi. (çözeltiler test süresi boyunca değiştirilmeden kalır)

Yarı-Statik test:
Test çözeltisi akışının olmadığı fakat test çözeltisinin uzun zaman aralıklarında (örneğin 24 saatte bir) düzenli olarak kısım kısım yenilendiği testtir.

Akış yollu test:
Test odalarında suyun devamlı yenilendiği testtir. Test edilen kimyasal, yenilenen su ile birlikte test ortamına aktarılır.

1.6.1. Reaktifler

1.6.1.1. Test maddelerinin çözeltileri

İstenen konsantrasyonda stok çözeltiler, maddelerin, 1.6.1.2' de açıklanan su ya da iyonlardan arındırılmış su içerisinde çözülmesi ile hazırlanılır.

Seçilen test konsantrasyonları stok çözeltilerin seyreltilmesiyle hazırlanılır. Eğer yüksek konsantrasyonlertest edilirse, madde doğrudan seyreltme suyu içerisinde çözülebilir.

Genellikle maddeler sadece çözünürlük sınırına kadar test edilmelidir. Bazı maddeler için (örneğin suda düşük çözünebilme yeteneğine, yüksek P_{OW} değerine, ya da sudaki doğru çözeltiden ziyade kararlı dispersiyon biçimine sahip), maksimum çözülebilir ya da kararlı konsantrasyonun elde edilmesini sağlamak için maddenin çözünürlük sınırlarının üzerinde bir konsantrasyonda test yürütmek kabul edilebilir. Bununla birlikte, aksi olmadıkça bu konsantrasyonun test sistemine zarar vermeyeceği hususu önemlidir. (örneğin maddenin su yüzeyindekifilminin suyun oksijenlenmesini önlemesi vs.)

Ultrasonik dağılma, organik çözücüler, emülsiyon yapıcılar veya dağıtıcılar suda az çözünürlüğe sahip maddelerin stok çözeltilerinin hazırlanmasında ya da test ortamında bu maddelerin dağılmasına yardımcı olmak için, birer yardımcı olarak kullanılabilirler. Bu tip yardımcı maddeler kullanıldığı zaman, tüm test konsantrasyonları aynı miktarda yardımcı madde içermeli ve ek olarak kontrol balığı test serilerinde kullanıldığı gibi yardımcı maddenin benzerkonsantrasyonuna maruz bırakılmalıdır. Bu tip yardımcıların konsantrasyonları olabildiğince azaltılmalıdır ama test ortamında hiçbir durumda litre başına 100 mg'ı aşmamalıdır.

Test, pH ayarlaması yapılmadan yürütülmelidir. Eğer pH da belirgin birdeğişimin kanıtı var ise, pH ayarlaması ile testin tekrar edilmesi ve sonuçların rapor edilmesi önerilir. Bu durumda, stok çözeltinin pH değeri, çok özel bir neden olmadıkça seyreltme suyunun pH değerine göre ayarlanmalıdır. Bu amaç için HCl ve NaOH tercih edilmelidir. Bu pH ayarlaması, stok çözeltide bulunan test maddesinin konsantrasyonunda belirgin bir değişiklik olmayacak şekilde yapılmalıdır. Eğer ayarlama ile test maddesinin herhangi bir kimyasal reaksiyonuna veya fiziksel olarak çökelmesine sebep olunuyorsa bu rapor edilmelidir.

1.6.1.2. Suyun kullanım süresi ve seyreltilmesi

Sukaynağı(potansiyel olarak zararlı konsantrasyonlardaki klor, ağır metaller ve diğer maddeler tarafından kirletilmemiş) olarak, iyi-kalitede doğal su ya da yeniden oluşturulmuş (Bakınız EK-I) su kullanılabilir. Toplam sertliği litre başına ($CaCO_3$ olarak) 10 ve 250 mg arasında olan ve pH' sı 6,0 dan 8,5 a kadar olan sular tercih edilir.

1.6.2. Düzenek

Tüm düzenek kimyasal olarak tepkimeye girmeyen(inert)maddelerden yapılmalıdır.
- otomatik seyreltme sistemi (akış testi için),
- oksijen metre,
- suyun sertliğinin belirlenmesi için araç ve gereçler,
- pH metre,
- sıcaklık kontrolü için uygun düzenek.

1.6.3. Test balığı

Balık sağlıklı olmalı ve gözle görülebilir herhangi bir kusuru olmamalıdır.

Kullanılan türler, bütün bir yıl boyunca bulunabilme, bakım kolaylığı, teste uygunluk, kimyasallara olan bağıl duyarlılık, herhangi bir ekonomik, biyolojik veya ekolojik faktör taşıma, gibi pratik kriterler temeline göre seçilmelidir. Elde edilen verilerin mevcut uluslararası uyumlu vekarşılaştırılabilir olması gibigereksinimlerde balık türlerini seçerken akıldan çıkarılmamalıdır.

Testin yürütülmesi için tavsiye edilen balık türlerinin listesi EK-II' de verilmektedir; Zebra balığı ve Gökkuşağı alabalığı tercih edilen türlerdir.

1.6.3.1. Barındırma

Test balığı birbirine yakın boy ve yaşa sahip mevcut balık stokundan seçilmelidir. Balık en az 12 gün aşağıda belirtilen koşullarda tutulmuş olmalıdır:

Yükleme:
Sisteme (yeniden sirkülasyonlu veya akış yollu) ve balık türlerine uygun,

Su:
Bakınız 1.6.1.2,

Işık:
Günlük olarak 12 ila 16 saat arası aydınlatma,

Çözünmüş oksijen konsantrasyonu:
Hava-doygunluk değerinin en az % 80' i,

Besleme:
Teste başlamadan 24 saat önce durdurulmak suretiyle haftada üç kez veya günlük,

1.6.3.2. Ölüm oranı

İşlemin başlatılmasını takiben 48 saat sonra ölümler kayıt edilir ve şu ölçütler uygulanır:
- yedi günde toplam sayının(populasyonun) % 10 'undan fazlası:

Serinin reddedilmesi
- toplam sayının (populasyonun) % 5 ve 10'u arası:

çalışma süresi fazladan 7 gün daha devam ettirilir, eğer daha fazla ölüm gerçekleşmezse çalışma gurubu kabul edilebilirdir, aksi takdirde reddedilmelidir.

- toplam sayının(populasyonun) % 5' inden az:

Seri kabul edilir.

1.6.4. Alıştırma

Bütün balıklar kullanılmadan en az 7 gün önce başlayarak testte kullanılacak aynı kalite ve sıcaklıktaki suya maruz bırakılmalıdır.

1.6.5. Testin performansı

Ana testte kullanılacak konsantrasyon aralığı ile ilgili bilgi elde etmek amacıylanihai testten öncebir aralık belirleme testi yapılabilir.

Test serisine ek olarak kontrollerden biri test maddesi olmadan yürütülür, yardımcı test maddesi kullanılması durumunda bir diğer kontrolde yardımcı test maddesi ile yürütülür.

Test bileşiğinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak, kalite ölçütlerini yerine getirmek için uygun statik, yarı-statik veya akış-yollu test yöntemi seçilmelidir.

Balıklar aşağıda belirtildiği şekilde maddeye maruz bırakılmalıdır:

- süre: 96 saat
- hayvan sayısı: konsantrasyon başına en az 7
- tanklar: yükleme gereksinimlerine bağlı olarak uygun kapasitede
- yükleme: statik ve yarı-statik testler için litre başına en fazla 1 gtavsiye edilir. Akış-yollu sistemler için daha yüksek yüklemeler kabul edilebilirdir
- test konsantrasyonu: 2,2 yi geçmeyecek sabit bir faktör ile değişen en az 5 farklı konsantrasyonla ve mümkün olduğu kadar %100 -0 ölüm oranı aralığını kapsayacak şekilde.
- su: Bakınız 1.6.1.2,
- ışık: günlük olarak 12 ile 16 saat arası aydınlatma,
- sıcaklık: türlere uygun biçimde (EK-II) fakat herbir test için ±1 °C olacak şekilde,
- çözünmüş oksijen konsantrasyonu: seçilen sıcaklık değeri için hava-doygunluk değerinin % 60 'ından az olmayacak şekilde,
- besleme: yok.

Balıklar ilk 2 ile 4 saat arası geçtikten sonra ve en az 24 saatlik aralarda incelenir. Kuyruk saplarına dokunulduğunda herhangi bir reaksiyon yoksa ve hiçbir solungaç hareketi görülmüyorsa balıkların öldüğüne kanaat getirilir.

Ölümler kaydedildiğinde ve gözlendiğinde ölü balıklar dışarı çıkarılır. Kayıtlar görünür anomalileri (örneğin, dengenin kaybolması, yüzme davranışındaki değişiklikler, solunumsal fonksiyonlar, pigmentleşme vs.) içerecek şekilde tutulmalıdır.

pH, çözünmüş oksijen miktarı ve sıcaklık ölçümleri günlük olarak yapılmalıdır.

Sınır testi

LC_{50} 'nin bu konsantrasyondan yüksek olduğunu göstermek için, bu test yönteminda tanımlanan işlem kullanarak litre başına 100 mg dasınır testi yapılabilir.
Eğer maddenin doğasına bağlı olarak test suyunda litre başına 100 mg konsantrasyona ulaşılamazsa limit testi kullanılan ortam (1.6.1.1 bölümüne bakınız) içindeki maddenin (veya kararlı bir dağılım oluşturacak maksimum çöznürlükte) çözünürlüğüne eşit konsantrasyonda gerçekleştirilmelidir.

Sınır değer testi kontrol veya kontrollerdeki sayı ile eşit olacak şekilde 7-10 balık kullanılarak yapılmalıdır. (Binom teorisine göre sıfır ölümle 10balık kullanıldığında, %99,9 güvenilirlikle LC_{50} sınır testinde kullanılan konsantrasyondan daha büyüktür. 7,8 veya 9 balık ve ölüm olmadığında LC_{50}nin kullanılan konsantrasyondan fazla olduğu en az %99 güvenilirlikle sağlanır.) Eğer ölümler olursa, tam bir çalışma gerçekleştirilmelidir. Eğer öldürücü yan etkenler gözlemlenirse bunlar kaydedilmelidir.

2. VERİLER VE DEĞERLENDİRME

Gözlemlerin kaydedildiği her süre için (24, 48, 72 ve 96 saat), konsantrasyone karşı her bir maruz kalma zamanındaki ölüm yüzdeleri, logaritmik-olasılık kağıdına çizilir.

Mümkün oldukça her gözlem zamanı için, LC_{50} ve güven sınırları (p= 0,05) standard yöntemler kullanılarak hesaplanmalıdır; bu değerler 1 veya en fazla iki anlamlı rakama kadar yuvarlanmalıdır. (iki anlamlı rakama yuvarlama örneği: 173,5 için 170, 0,127 için 0,13, 1,21 için 1,2).

Konsantrasyon/yüzde tepki eğrisinin eğiminin LC_{50}' nin hesaplanmasına izin vermeyecek şekilde dik olması durumunda, grafikten tahmini bir değer bulunması yeterlidir.

Oranları 2,2 olan iki ardışık konsantrasyonda, sırasıyla % 0 ve 100 ölüm oranı varsa; bu ikikonsantrasyon değerleri arasındaki aralık LC_{50}aralığını belirlemek için yeterlidir.

Test maddesinin kararlılığının ve homojenliğinin korunamadığı gözlemlenirse, bu rapor edilmeli ve sonuçlar yorumlanırken dikkatli olunmalıdır.

3. RAPORLAMA

Test raporu mümkünse aşağıdaki bilgileri içermelidir:

- test balığı hakkında bilgi (bilimsel ismi, ırkı, tedarikçisi, herhangi bir ön işlem, her test konsantrasyonunda kullanılan büyüklük ve sayı);
- seyreltme suyu kaynağı, ana karakteristik kimyasal parametreler (pH, sertlik, sıcaklık);
- su çözünürlüğü düşük olan maddelerin varlığı durumunda, stok ve test çözeltilerinin hazırlanış yöntemi;
- herhangi bir şekilde yardımcı maddeler varsa konsantrasyonları;
- kullanılan konsantrasyonların listesi ve test çözeltisi içinde test edilen kimyasalların konsantrasyonlarının kararlığı hakkında mümkün olan herhangi bir bilgi;
- eğer kimyasal bir analiz gerçekleştirilmişse, kullanılan yöntemler ve elde edilen sonuçlar;
- yapılmışsa sınır test sonuçları;
- kullanılan test işleminin (statik, yarı-statik, dozlama oranı, akış-yollu hız, havalandırılıp havalandırılmadığı, balık yüklemesi vs.) seçimi ve detayları ile ilgili gerekçeler;
- test gereçlerinin tanımlanması;
- aydınlatma düzeni;
- her 24 saat için test çözeltisinin çözünmüş oksijen konsantrasyoni, pH'ı ve sıcaklığı;
- yerine getirilen kalite ölçütlerinin kanıtları;
- tavsiye edilen her gözlem zamanında her konsantrasyonun ve kontrolun (ve eğer gerekiyorsa yardımcı madde ile kontrol) toplam ölüm oranını gösteren tablo;
- test sonunda konsantrasyon/yüzde tepki eğrisi grafiği;
- eğer mümkünse, tavsiye edilen her gözlem zamanlarında LC_{50} değerleri;
- LC50 değerlerinin bulunmasında kullanılan istatistiksel yöntemler;
- eğer bir referans maddesi kullanılmışsa, elde edilen sonuçlar;
- test süresi boyunca ölüme yol açmayan en yüksek test konsantrasyoni değerleri;
- test süresi boyunca ölüme yol açan en düşük test konsantrasyonu.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of theCouncil C(81) 30 final

andupdates.
(2) AFNOR -Determination of the acute toxicity of a substance to Brachydaniorerio – 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) TS 6020 ISO 7346/1, /2 and /3 -Su Kalitesi- Maddelerin Tatlı Su Balığı [BrachydanioRerio Hamilton- Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] Üzerindeki Anlık Öldürücü Zehirliliğinin (Toksisitesinin) Tayini - Bölüm 1: Statik Metot, Bölüm 2: Yarı Statik Metot, ürekli Akış Metodu
(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probe nahme und Normung von Wasseruntersuchungs methoden -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 –Bepalingvan de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980.
(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macro invertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4 -78-012, January 1978.
(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWAWPCF,1975.
(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March1979.
(14) Verfahrensvorschlag des Umwelt bundesamtes zum akutenFisch-Test. Rudolph, P. UndBoje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertungvon Umwelt chemikalien nach dem Chemikalien gesetz, ecomed 1986.
(15) Litchfield, J. T .andWilcoxon, F., A simplified methodfor evaluating doseeffects experiments, J.Pharm, tExp. Therap., 19 49, vol. 96,99.
(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
(17) Sprague, J .B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity.WaterRes., 1969, vol. 3,793-821.
(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results.WaterRes. 1970, vol. 4, 3-32.
(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation(editedby F.I. Mayerand J.L. Hamelink). American Society forTestingandMaterials, ASTMSTP 634,1977, 65-84.
(20) Stephan, C.E.,Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. And Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

Ek- I

Yeniden oluşturulmuş su

Uygun seyreltme suyu örneği

Bütün kimyasallar analitik saflıkta olmalı.

Su iyi-kalitede damıtılmış su veya iletkenliği 5 μScm^{-1}'den azolan iyonlardan arındırılmış su olmalı.

Suyun destilasyonu için kullanılan düzenekler bakırdan yapılmış kısımlar içermemelidir.

Stok çözeltiler

$CaCl_2.2H_2O$ (kalsiyum klorür dihidrat): 11,76 g
Su içerisinde çöz ve 1 litreye seyrelt.
$MgSO_4.7H_2O$ (mağnezyum sülfat heptahidrat): 4,93 g
Su içerisinde çöz ve 1 litreye seyrelt.
$NaHCO_3$(sodyum hidrojen karbonat): 2,59 g
Su içerisinde çöz ve 1 litreye seyrelt.
KCI (potasyum klorür): 0,23 g
Su içerisinde çöz ve 1 litreye seyrelt.

Yeniden oluşturulmuş seyreltme suyu

Dört stok çözeltisinden 25 ml alarak karıştır 1 litreye su ile tamamla.

Çözünmüş oksijen konsantrasyoni hava-doygunluk değerine eşit oluncaya kadar havalandır. pH 7,8 ± 0,2 olmalıdır.

Eğer gerekliyse pH' ı NaOH (sodyum hidroksit) ve HCl (hidroklorik asit) kullanarak ayarla.

Daha önce hazırlanmış olan seyreltme suyu 12 saattir bekliyorsa daha fazla havalandırılmamalıdır.

Çözeltideki Ca ve Mg iyonlarının toplamı litrede 2,5 mmol. Ca:Mg iyonlarının oranı 4:1 ve Na:K iyonlarının oranı 10:1'dir. Bu çözeltinin toplam bazlığı litrede 0,8 mmol dür.

Seyreltme suyunun hazırlanmasındaki herhangi bir sapma suyun bileşimini ve özelliklerini değiştirmemelidir.

Ek-II

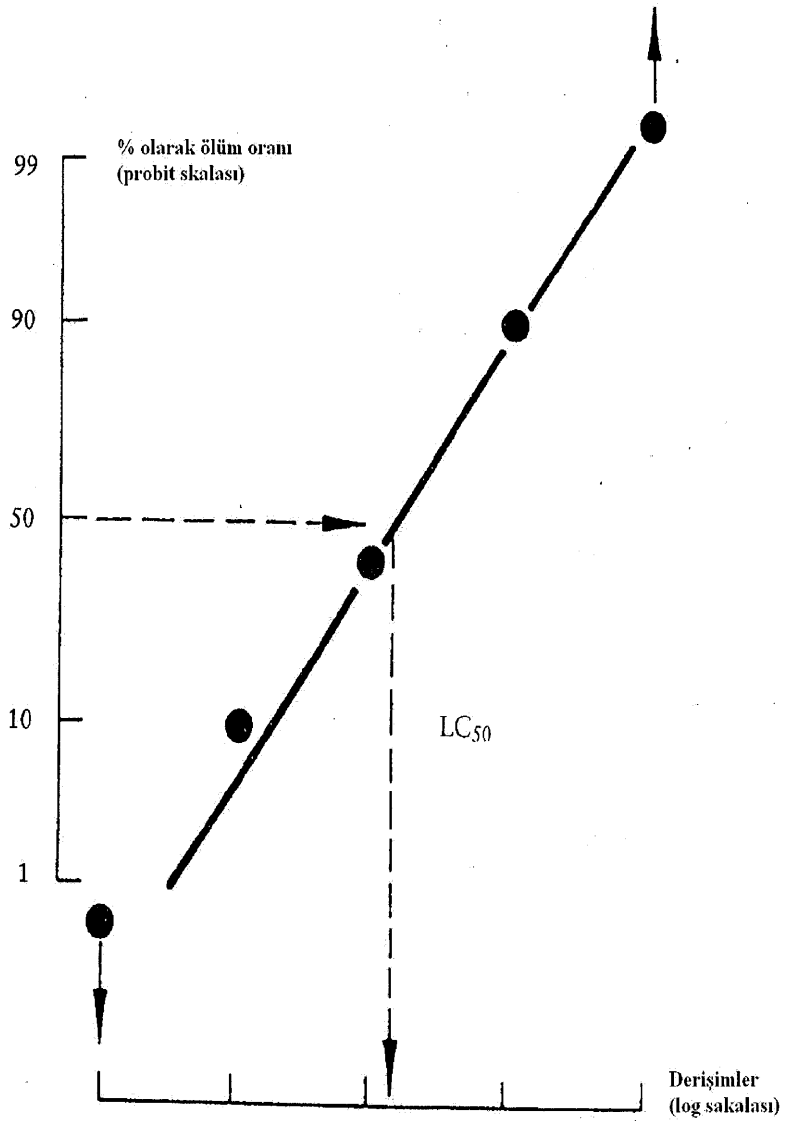
Gerekli türler	Gerekli test sıcaklığı aralığı (°C)	Test hayvanın gerekli toplam uzunluğu (cm)
Brachydaniorerio(Teleostei, Cyprinidae)(Hamilton-Buchanan) Zebra Balığı-Zebrab-fish	20-24	3,0 ± 0,5
Pimephalespromelas(Teleostei, Cyprinidae)(Rafinesque) Fathead Minnow	20-24	5,0 ± 2,5
Cyprinuscarpio(Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Sazan-Commoncarp	20-24	6,0 ± 2,0
Oryziaslatipes(Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Redkillifish	20-24	3,0 ± 1,0
Poeciliareticulata(Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20-24	3,0 ± 1,0
Lepomismacrochirus(Teleostei, Centrarchidae)(Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	20-24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchusmykiss(Teleostei, Salmonidae)(Walbaum 1988) Gökkuşağı alabalığı-Rainbowtrout	12-17	6,0 ± 2,0
Leuciscusidus(Teleostei, Cyprinidae)(Linneaus 1758) Golden Orfe	20-24	6,0 ± 2,0

Toplama

Yukarıda listelenen balıklar beslemesi kolay ve tüm bir yıl boyunca geniş oranda bulunabilen balıklardır. Yavrulamaya, hastalık altında ve kontrollu parazit koşullarında balık çiftliklerinde ve laboratuvarlarda yetiştirilmeye eğilimlidirler, bu sebeple nesli bilinen test hayvanları sağlıklı olacaklardır. Bu balıklar dünyanın birçok bölgesinde bulunabilirler.

Ek-III

Konsantrasyon: ölüm yüzdesi örneği



Log olasılık kağıdı kullanarak LC_{50}' nin elde edilmesi örneği

C.2 *DAPHNIA SP.* AKUT HAREKETSİZLEŞTİRME TESTİ

1. YÖNTEM

Bu akut hareketsizleştirme test yöntemi, OECD TG 202'ye (2004) eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu yöntem su pirelerinde (*daphnia sp.*) kimyasalların etkilerini değerlendirmek için akut toksisite testini tanımlar. Mümkün olduğunca mevcut yöntemlerden de faydalanılmıştır (1)(2)(3).

1.2. Tanımlar

Bu yöntem kapsamında aşağıdaki tanımlar kullanılır:

EC50: Belirlenen maruz kalma süresinde su pirelerinin % 50'sinin hareketsizleşeceği tahmini konsantrasyondur. Başka bir tanım kullanılırsa referans bilgisiyle birlikte raporlanmalıdır.

Hareketsizleştirme: Test tüpünün hafifçe çalkalanmasından sonra 15 dakika içerisinde yüzemeyen hayvanlar, antenlerini hareket ettirebilseler bile, hareketsizleştirilmiş sayılır.

1.3. Test yöntemi ilkeleri

Testin başında 24 saatlikten küçük olan genç su pireleri bir konsantrasyon aralığında 48 saatlik bir sürede test maddesine maruz bırakılır. Hareketsizleştirme 24. ve 48. saatte kayıt edilir ve kontrol değerleriyle karşılaştırılır. Sonuçlar 48 saatlik EC50 değerini hesaplamak için analiz edilir (bkz. Bölüm 1.2 Tanımlar). 24 saatlik EC50 değerinin hesaplanması tercihe bağlıdır.

1.4. Test maddesi hakkında bilgi

Test maddesinin suda çözünürlüğü ve buhar basıncı bilinmeli, raporlanmış geri kazanım yeterliliğiyle birlikte, maddenin test çözeltisi içindeki miktarın belirleneceği güvenilir bir analitik yöntem ve saptama sınırları mevcut olmalıdır. Yapısal formül, maddenin saflığı, suda veya ışıkta kararlılığı, Pow ve kolay biyobozunurluk testinin sonuçlarının bilinmesi faydalıdır (bkz. Yöntem C.4)

Not: test yapılmasını zorlaştıran fizikokimyasal özellikleri olan maddeler için rehber (4)'de verilmiştir.

1.5. Referans maddeler

Referans maddesi test koşullarının güvenilir olup olmadığının kontrolü için EC50'nin ölçümünde test edilebilir. Uluslararası halka-testlerinde kullanılan toksik maddeler (1)(5) bu

amaç için tavsiye edilir[1]. Referans maddesiyle yapılan testler yılda en az iki defa ve tercihen her ay yapılmalıdır.

1.6. Kalite kriterleri

Testin geçerli olması için aşağıdaki performans kriteleri uygulanmalıdır:

- Çözücü ajanları içeren kontrollerde dahil olmak üzere kontrollerde su pirelerinin % 10'undan fazlası hareketsizleştirilmemelidir.
- Testin sonunda kontrol ve test tüpündeki çözünmüş oksijen konsantrasyonu en az ≥ 3 mg/l olmalıdır.

Not: İlk kriter için kontrol su pirelerinin % 10'undan fazlası hareketsizleşme veya diğer hastalık yada stres işareti, örneğin renksizleşme, su yüzeyinde tutulu kalma gibi olağandışı davranış göstermemelidir.

1.7. Test yönteminin tanımı

1.7.1. Düzenek

Test çözeltisiyle temas edecek test tüpleri ve diğer düzenek ekipmanları camdan veya kimyasal tepkimeye girmeyecek başka bir malzemeden yapılmış olmalıdır. Test tüpleri veya beherleri genelde cam olur ve her kullanımdan önce standart laboratuvar usullerine göre temizlenir. Test tüpleri buharlaşmadan dolayı su kaybını engellemek için gevşekçe kaplanmalı ve çözeltinin içine toz girmesi engellenmelidir. Uçucu maddeler tamamen doldurulmuş ve kısıtlayıcı veya çok düşük oksijen girişini engellemeye yetecek kadar büyük kapalı tüplerde test edilmelidir (bkz. Bölüm 1.6 ve Bölüm 1.8.3'ün ilk paragrafı).

Ek olarak aşağıdaki ekipmandan bazıları yada tümü kullanılır: oksijen-metre (mikroelektrodlu veya düşük hacimli numunelerde çözünmüş oksijeni ölçmek için uygun diğer ekipman), pH-metre, sıcaklık kontrolü için yeterli araç, toplam organik karbon konsantrasyonunu (TOC) ölçen araç, kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ölçen araç, sertlik ölçen araç.

1.7.2. Test organizması

Daphnia pulex gibi diğer uygun su piresi türleri de kullanılabiliyor olsa da, *Daphnia magna* Straus bu test için tercih edilen türdür. Testin başında, hayvanlar 24 saatlikten daha küçük olmalı ve değişkenliği azaltmak için ilk kuşaktan olmamalıdır. Hayvanlar sağlıklı bir stoktan alınır (yüksek ölüm oranı, erkek veya kış yumurtalarının (ephippia) varlığı, ilk neslin üretiminde gecikme, renksizleşmiş hayvanlar gibi herhangi bir stres işareti göstermemelidir). Testlerde kullanılan bütün organizmalar aynı su piresi stokundan oluşturulan kültürlerden alınır. Stok hayvanları test hayvanları ile aynı kültür koşullarında (ışık, sıcaklık, ortam) korunur. Eğer test için kullanılan su piresi kültür ortamı rutin su piresi kültüründen farklı ise test öncesi ortama alıştırma süresi uygulanması iyi olur. Bunun için yavru su pireleri teste başlamadan 48 saat önce test sıcaklığındaki seyreltme suyunda korunur.

[1] Laboratuvarlar arası test sonuçları ve ISO 6341'in teknik düzeltmesi, potasyum dikromatın 24 saatlik EC50 değerinin 0,6 mg/l den 1,7 mg/l ye kadar olduğunu göstermektedir.

1.7.3. Bekleme ve seyreltme suyu

Eğer su pireleri kültür, uyum ve test süresince stres işareti göstermeden hayatta kalabiliyorlarsa doğal su (yüzey ya da yeraltı suyu), yeniden oluşturulmuş su veya kloru alınmış musluk suyu bekleme veya seyreltme suyu olarak kullanılabilir. Kimyasal özellikleri Ek-I'de listelenen kabul edilebilir seyreltme suyu ile uyumlu olan herhangi bir su test suyu olarak uygundur. Su test boyunca aynı kaliteyi korumalıdır. Yeniden oluşturulmuş su belirli miktarda deiyonize veya distile suya kabul edilen analitik derecede belirli miktarda reaktif katılarak yapılabilir. Yeniden oluşturulmuş su örnekleri (1)(6) ve Ek-II'de verilmektedir. Ek-II'de yer alan M4 ve M7 gibi şalet oluşturucuları içeren ortamların metal içeren test maddelerinden sakınılması gerekir. pH 6-9 aralığında olmalıdır. *Daphnia magna* için sertliğin 140-250 mg/l ($CaCO_3$) aralığında olması tavsiye edilir, ancak diğer su piresi türleri için daha düşük sertlikte uygun olabilir. Seyreltme suyu çözünmüş oksijen konsantrasyonunun doygunluğa ulaşması amacıyla test için kullanılmadan önce havalandırılır.

Eğer doğal kullanılıyorsa, kalite parametreleri yılda en az iki defa veya parametrelerin önemli boyutta değiştiğinden şüphelenildiği durumlarda ölçülmelidir (bkz. önceki paragraf ve Ek-I). Ağır metal (örneğin Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) ölçümleri de yapılmadır. Kloru giderilmiş musluk suyu kullanılırsa günlük klor analiz gerekebilir. Eğer seyreltme suyu yüzey ya da yer altı suyu ise iletkenlik ve toplam organik karbon (TOK) veya kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ölçülmelidir.

1.7.4. Test çözeltileri

Seçilen konsantrasyonlardaki test çözeltileri genellikler stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanır. Stok çözelti tercihen test maddesinin seyreltme suyunda çözünmesiyle hazırlanır. Çözücülerin, emülgatörlerin veya dispersanların kullanılmasından mümkün oldukça kaçınılmalıdır. Bununla birlikte, bu bileşikler bazı durumlarda uygun konsantrasyondaki stok çözeltilerini hazırlamada gerekli olabilir. Uygun çözücüler, emülgatörler ve dispersanlar için rehber (4)'de verilmiştir. Test çözeltisindeki test maddesi seyreltme suyundaki çözünürlük limitlerini hiçbir zaman geçmemelidir.

Test, pH ayarlanması yapmadan yürütülür. Eğer pH 6-9 aralığında kalmıyorsa, ikinci bir test yapılır ve bu testte stok çözeltinin pH'ı, test maddesi eklenmeden önceki seyreltme suyunun pH'ına eşit hale getirilir. pH, stok çözelti konsantrasyonunu önemli bir şekilde değiştirmeyecek, kimyasal bir tepkimeye veya test maddesinin buharlaşmasına yol açmayacak bir şekilde ayarlanmalıdır. HCl ve NaOH tercih edilir.

1.8. İşlem

1.8.1. Maruz kalma koşulları

1.8.1.1. Test grupları ve kontroller

Test tüpleri, uygun miktarda seyreltme suyu ve test maddesi çözeltileri ile doldurulur. Tüpteki hava/su hacim oranı test ve kontrol grubunda eşit olmalıdır. Sonra, su pireleri test tüplerine yerleştirilir. Her test konsantrasyonu ve kontrol grubu başına tercihen beş hayvanlık dört grup halinde en az 20 hayvan kullanılır. Her hayvan içim en az 2 ml test çözeltisi gereklidir (yani test tüpü başına 5 su piresi için 10 ml hacim). Test için yarı-statik yenilenme sistemi veya test maddesi kararlı değilse akışlı sistem kullanılabilir.

Uygulama serilerine ilaveten, seyreltme-su kontrol serisi için bir tane ve ayrıca, ilgili olduğu yerlerde, çözücü ajanı içeren kontrol serisi için de bir tane test yapılır.

1.8.1.2. Test konsantrasyonları

Test maddesinin toksisitesi hakkında mevcut bilgi bulunmuyorsa, aralık-bulma testi yapılarak belirleyici test için konsantrasyon aralığı tespit edilir. Bu amaçla, test maddesinin çok çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılırlar. Beş su piresi her test konsantrasyonunda en az 48 saat veya daha az maruz bırakılır; tekrar gerekli değildir. Aralık bulma testi için uygun veri daha az sürede elde edilebiliyorsa, maruz kalma süresi kısaltılabilir (örneğin 24 saat veya daha az).

En az beş test konsantrasyonu kullanılır. Bu konsantrasyonlar, tercihen 2,2'yi aşmayan katlarda bir geometrik seri ile düzenlenir. Beşten daha az sayıdaki konsantrasyon kullanılırsa, gerekçe gösterilmelidir. En yüksek test konsantrasyon ile %100 hareketsizlik; en düşük konsantrasyon ile gözlemlenen etki bulunmaması tercih edilir.

1.8.1.3. İnkübasyon koşulları

Sıcaklık 18 °C ile 22 °C aralığında olmalı ve her bir test için ±1 °C aralığında sabit tutulmalıdır. 16 saat aydınlık, ardından 8 saat karanlık döngüsü tavsiye edilir. Özellikle test maddesinin ışıkta kararsız olduğu durumlarda, tam karanlık kabul edilir.

1.8.1.4. Süre

Test süresi 48 saattir.

1.8.2. Gözlemler

Her test tüpünde, testin başlangıcından itibaren 24. ve 48. saatlerde hareket etmeyen su pireleri olup olmadığı kontrol edilir (Tanımlar için 1.2'ye bkz.). Hareketsizliğe ilaveten, bütün anormal davranışlar veya görünüşler rapora yazılır.

1.8.3. Analitik ölçüler

Testin başında ve sonunda kontrol grubunda (gruplarında) ve en yüksek test maddesi konsantrasyonunda Çözünmüş oksijen ve pH ölçülür. Kontrollerdeki çözünmüş oksijen konsantrasyonu geçerlilik ölçütlerini (Bölüm 1.6'ya bkz.) sağlamalıdır. pH herhangi bir testte 1,5 birimden daha fazla değişkenlik göstermemelidir. Sıcaklık, genelde kontrol tüplerinde veya ortam havasında ölçülür. Tercihen test süresi boyunca devamlı olarak ama en azından testin başlangıcı ve sonunda en az iki defa olmak üzere sıcaklık ölçülür ve kayıt tutulur.

Test maddesinin konsantrasyonu, en azından en yüksek ve en düşük test konsantrasyonlarında, testin başlangıcı ve sonunda ölçülmelidir (4). Sonuçların ölçülmüş konsantrasyonlara dayandırılması tavsiye edilir. Bununla beraber, test maddesi konsantrasyonunun test süresi boyunca nominalin veya başlangıçta ölçülen konsantrasyonun ±%20 aralığında korunduğu yeterli bir şekilde kanıtlanabilirse, bu durumda sonuçlar nominal değere veya ölçülmüş ilk değere dayandırılabilir.

1.9. Sınır testi

Bu yöntemde açıklanan prosedürler kullanılarak, test maddesinin 100mg/l'lik konsantrasyonunda veya test ortamındaki azami çözünürlük sınırında (hangi konsantrasyon daha düşükse) bir sınır testi yapılabilir. Bunun amacı, EC50'nin ölçülen konsantrasyondan daha büyük olduğunu göstermektedir. Sınır testinde, (tercihen beşer su piresi içeren dört gruba ayrılmış)20 su piresi kullanılır. Kontrol(ler)de de 20 su piresi kullanılmalıdır. Hareketsizlik oluşursa, tam bir çalışma yürütülmelidir. Gözlemlenen bütün anormal davranışlar raporlanmalıdır.

2. VERİ

Veri, tablo şeklinde özetlenir; her uygulama ve kontrol grubu için kullanılan su piresi sayısı ve her gözlemdeki hareketsizlik sayısı bu tabloda gösterilir. 24. ve 48. saatlerde ölçülen hareketsizlik yüzdesinin, test konsantrasyonlarına karşı grafiği çizilir. Eğrilerin eğimlerini ve %95 güven aralığında EC_{50}'yi (p=0,05)hesaplamak için uygun istatistik yöntemleri (ör. Probit analizi, vs.) kullanılarak veri analizi edilir (7)(8).

EC_{50} hesaplarken kullanılan standart yöntemler elde edilen verilere uygulanamıyorsa EC_{50}'ye yakın bir değer hesaplayabilmek için hareketsizliğe yol açmayan en yüksek konsantrasyon ve %100 hareketsizlikle sonuçlanan en düşük konsantrasyon kullanılır (bu iki konsantrasyonun geometrik ortalaması alınır).

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdakileri içerir:

Test maddesi:
- Fiziksel özellikleri ve ilgili fiziko-kimyasal özellikleri,
- Saflık dâhil kimyasal kimlik verisi.

Test türleri:
- Su piresi kaynağı ve türleri, (eğer biliniyorsa) kaynak tedarikçisi ve kullanılan kültür koşulları (besinin kaynağı, çeşidi ve miktarı, besleme sıklığı dahil).

Test koşulları:
- Test tüplerinin tarifi: tüp tipleri, çözelti hacmi, tüp başına kullanılan su piresi sayısı, konsantrasyon başına kullanılan test tüpü (tekrarların) sayısı,
- Stok ve test çözeltisi hazırlama yöntemleri, kullanılan her türlü çözücü veya dispersan ve konsantrasyonları,
- Seyreltme detayı: kaynak ve su kalitesi özellikleri (pH, sertlik, Ca/Mg oranı, Na/K oranı, alkalite, iletkenlik, vs.); yeniden oluşturulmuş su kullanıldıysa bileşimi,
- İnkübasyon koşulları: sıcaklık, ışık yoğunluğu ve sıklığı, çözünmüş oksijen, pH, vs.

Sonuçlar;

- Kontrollerde ve her bir uygulama grubunda, her bir elde edilme zamanında hareketsiz olan veya olumsuz etkiler gözlenen (anormal davranışlar dahil) su pirelerinin sayıları ve oranları ve etki elde edilen ortamın tanımı,
- Mümkünse, sonuçlar ve referans maddesi ile gerçekleştirilen testin tarihi,
- Nominal test konsantrasyonları ve test kaplarındaki test maddesi konsantrasyonu tayini için gerçekleştirilen tüm analizlerin sonuçları; metodun geri dönüşüm verimliliği ve tayin sınırı da raporlanmalıdır,
- Sıcaklık, pH ve çözünmüş oksijenin test süresince tüm fizikokimyasal ölçümleri,
- Beslenen deneklerin güvenli aralıklarda 48 saat hareketsiz kaldıkları EC50 değeri ve hesaplama için kullanılan grafikler, doz-cevap eğrilerinin eğimleri ve bunların standart sapmaları; EC50 değerinin tayini için kullanılan istatistiki yöntemler; (bu veriler 24 saat hareketsiz kalım için de hesaplandıysa rapor edilmelidir),
- Test yönteminden herhangi bir sapma ve bu sapmadan dolayı sonucun nasıl etkilendiği.

4. KAYNAKLAR

(1) ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using Daphnia spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to Daphnia.

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: Daphnia magna Reproduction Test,adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. p.65-84

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK

Ek- I

KABUL EDİLEBİLİR SEYRELTME SUYUNUN BAZI KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Madde	Konsantrasyon
Partikül maddesi	< 20 mg/l
Toplam organik karbon	< 2 mg/l
İyonize olmamış amonyak	< 1 µg/l
Artık Klor	< 10 µg /l
Toplam organafosforik pestisit	< 50 ng/l
Toplam organoklorür pestisit ve poliklorlu bifeniller	< 50 ng/l
Toplam organik klor	< 25 ng/l

Ek- II

YENİDEN OLUŞTURULMUŞ TEST SUYU ÖRNEKLERİ

ISO Test Suyu (1)

Stok Çözelti (tek madde)		Yeniden oluşturulmuş suyun hazırlanması için, 1 L suya ilave edilecek stok çözelti hacimleri
Madde	1 L suya eklenen miktar (*)	
Kalsiyum klorür $CaCl_2, 2\ H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnezyum Sülfat $MgSO_4, 7\ H_2O$	4,93 g	25 ml
Sodyum Bikarbonat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Potasyum Klorür KCl	0,23 g	25 ml
(*) Uygun saflığa sahip su, örn. deiyonize, distile,veya iletkenliği 10 µS.cm^{-1}'den az olan ters ozmoza tabi tutulmuş		

Elendt M7 ve M4 ortamı

Elendt M4 ve M7 ortamına aklimatizasyon

Bazı laboratuvarlar su pirelerini M4 ve M7 ortamında doğrudan transferinde sıkıntılar yaşamışlardır. Ancak aşamalı aklimatizasyon ile başarı sağlandığı gözlenmiştir, örn. kendi ortamından %30 Elendt ortamına, sonra %60 Elendt ve %100 Elendt ortamına. Aklimatizasyon için bir aylık bir süre gereklidir.

Hazırlık

Eser Elementler

İlk önce uygun saflıktaki suda (örn. deiyonize, distile veya ters osmoza tabi tutulmuş) Münferit Eser Elementlerin Stok Çözeltileri (I) ayrılmalıdır. Farklı olan bu Stok (I) çözeltisinden tüm eser elementleri içeren (birleşik çözelti) ikinci bir stok çözelti olan Stok (II) hazırlanmalıdır. örn.;

Stok (I) çözeltisi/çözeltileri (tek madde)	Suya eklenen miktar (mg/l)	Konsantrasyon (M4 ortamı ile ilgili)	Birleşik Stok Çözeltisi (II) nin hazırlanması için Stok (I) çözeltisinden suya eklenmesi gereken miktar (mg/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20000-kat	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7210	20000-kat	1,0	0,25
LiCl	6120	20000-kat	1,0	0,25
RbCl	1420	20000-kat	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3040	20000-kat	1,0	0,25
NaBr	320	20000-kat	1,0	0,25
$Na_2 MoO_4.2H_2O$	1230	20000-kat	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20000-kat	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20000-kat	1,0	0,25
$CoCl_2.6H_2O$	200	20000-kat	1,0	0,25
KI	65	20000-kat	1,0	1,0
$Na_2 SeO_3$	43,8	20000-kat	1,0	1,0
$NH_4 VO_3$	11,5	20000-kat	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5000	2000-kat	-	-
$FeSO_4.7H_2O$	1991	2000-kat	-	-
Na_2EDTA ve $FeSO_4$ çözeltilerinin her ikisi de ayrı ayrı, birleştirilir ve hemen otoklava konulur.				
2 litre Fe-EDTA çözeltisi		1000-kat	20,0	5,0

M4 ve M7 ortamı

M4 ve M7 ortamı Stok (II) çözeltisi, makro gıdalar ve vitaminler kullanılarak aşağıdaki gibi hazırlanır:

	Suya eklenen miktar (mg/l)	Konsantrasyon (M4 ortamı ile ilgili)	Ortamı hazırlamak için eklenmesi gereken Stok (II) Çözeltisi (mg/l)	
			M4	M7
Stok (II) Çözeltisi (birleşik eser elementler)		20 kat	50	50
$CaCl_2.2H_2O$	293800	1000-kat	1,0	1,0
$MgSO_4$, 7 H_2O	246600	2000-kat	0,5	0,5
KCl	58000	10000-kat	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64800	1000-kat	1,0	1,0
Na_2SiO_3 9 H_2O	50000	5000-kat	0,2	0,2
$NaNO_3$	2740	10000-kat	0,1	0,1
KH_2PO_4	1430	10000-kat	0,1	0,1
K_2HPO_4	1840	10000-kat	0,1	0,1
Birleşik Vitamin Stok	-	10000-kat	0,1	0,1
Birleşik Vitamin Stok'u aşağıda gösterildiği gibi 3 Vitamini 1 Litre suya ekleyerek oluşturulur.				
Tiamin hidroklorür	750	10000-kat		
Siyanokobalamin (B12)	10	10000-kat		
Biotin	7,5	10000-kat		

Birleşik Vitamin Stok'u küçük parçalar halinde donmuş olarak saklanır. Vitaminler kullanımdan kısa bir süre önce ortama eklenir.

Not: Tuz çökeleklerinin oluşumunu engellemek için, stok çözelti parçalarını yaklaşık 500-800 ml deiyonize suya ekleyin ve daha sonra 1 litreye tamamlayın.

Not: M4 ortamına ilişkin ilk yayın Elendt'de bulunabilir,B.p. (1990).Selenium deficiency in crustacea;an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus.Protoplasma,154,25-33

C.3. TATLI SU YOSUNLARI VE SİYANOBAKTERİ BÜYÜME YAVAŞLATMA (İNHİBİSYON) TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem, OECD TG 201(2006) ile eşdeğerdir (1).

1.1. Giriş

Test yöntemleri, bilimsel ilerlemeler ışığında periyodik olarak gözden geçirilmekte ve güncellenmektedir. Test yöntemi C.3'ün, ek türleri içermesi ve kimyasalların risk değerlendirmesi ve sınıflandırılması için olan gereksinimleri karşılaması için revize edilmesi gerekmekteydi. Revizyon, ilk kabulden sonra meydana gelen yaygın uygulamalara, su yosunu (alg) toksisite alanındaki bilimsel ilerlemeye ve yaygın olarak düzenleyicilerdeki kullanıma dayalı olarak tamamlanmıştır.

1.2. Tanımlar

Aşağıdaki tanımlar ve kısaltmalar, bu Test Yönteminin amaçları için kullanılmaktadır:

Biyokütle: verilen hacme göre ifade edilen popülasyonda bulunan canlı maddenin kuru ağırlığıdır; örneğin mg alg/litre test çözeltisi. Genellikle biyokütle, kütle olarak tanımlanır fakat bu test içerisinde bu sözcük, her hacim için olan kütleyi tanımlamaktadır. Bu test ile biyokütle yerine geçebilecek hücre sayımı, floresans vb. değerler de ölçülür ve bundan dolayı bu ölçümler için de "biyokütle" terimi kullanılır.

Varyasyon katsayısı (CV):standart sapmanın ortalamaya oranı olarak tanımlanmış olan parametre değişkenliğinin boyutsuz ölçümüdür. Bu yüzdelik değer olarak da ifade edilebilir. Tekrar kontrol kültürlerindeki belirli büyüme hızı ortalamasının ortalama varyasyon katsayısı, aşağıdaki gibi hesaplanmalıdır:

1. Ayrı ayrı tekrarlar için günlük veya bölüm başınahesaplanan büyüme hızlarının dışında kalan belirli büyüme hızı ortalamasının %CV'si hesaplanır.

2. Tekrar kontrol kültürlerinde günlük veya bölüm başına hesaplanan belirli büyüme hızı varyasyonunun ortalama katsayısını almak için nokta 1'deki hesaplanmış bütün değerlerin ortalama değeri hesaplanır.

EC_x: belirtilen maruz kalma süreci (eğer tam ya da normal test sürecindedeğişiklik varsa açıkça bahsedilir) içerisinde test organizmalarının büyümesindeki % x (örn. %50) indirgenmesiyle sonuçlanan test ortamında çözünen test maddesinin konsantrasyonudur. Büyüme hızından (r) ya da verimden (y) elde edilen bir EC değerini açık bir biçimde belirtmek için, 'E_rC' ve 'E_yC' sembolleri sırasıyla kullanılır.

Büyüme ortamı: test yosununun test maddesine maruz bırakıldığı ve büyüdüğü tam sentetik kültür ortamıdır. Test maddesi normal olarak, test ortamında çözündürülür.

Büyüme hızı (ortalama büyüme hızı): maruz kalma sürecinde biyokütledeki logaritmik artıştır.

Etkinin gözlemlendiği en düşük konsantrasyon (LOEC): kontrol ile karşılaştırıldığında

verilen maruz kalma sürecinde büyüme üzerine istatistiksel olarak dikkate değer bir şekilde azaltma etkisi olan ($p < 0,05$) gözlemlenmiş test edilmiş en düşük konsantrasyondur. Bununla birlikte yukarıdaki bütün test konsantrasyonlarının, LOEC'de gözlemlenmiş olana eşit ya da bundan daha büyük zararlı etkisi olması gereklidir. Bu iki koşula kanaat getirilemediğinde, LOEC'in (ve nitekim NOEC'in) nasıl seçildiğini göstermek için tam bir açıklama verilmelidir.

Etki gözlemlenmeyen konsantrasyon (NOEC): LOEC'den hemen sonra gelen test konsantrasyonudur.

Tepki değişkeni: biyokütleyi tanımlayan farklı hesaplama yöntemleriyle herhangi bir ölçülmüş parametreden toksisite tahmini için elde edilen değişkendir. Bu yöntem için büyüme hızı ve verim, direkt ya da bahsi geçen vekillerden herhangi birinin biyokütlesinin ölçülmesinden elde edilen tepki değişkenidir.

Belirli büyüme hızı: gözlem (bu Test Yöntemindeki, biyokütle) ve ilgili zaman aralığı parametresinin doğal logaritma farklılığının bölümü olarak tanımlanmış olan tepki değişkenidir.

Verim: maruz kalma sürecinin başlangıcında ölçüm değişkeninden çıkan maruz kalma süreci bitimindeki biyokütleyi ifade etmek için ölçüm değişkeni değeridir.

1.3. Testin uygulanabilirliği

Bu Test Yöntemi, test koşulları altında muhtemelen suda duran ve suda çözünen maddelere kolay bir şekilde uygulanabilir. Uçucu, hızlı adsorbe eden, renklendirilmiş, su içerisinde az çözünen maddelerin ya da test ortamında besinlerin veya minerallerin kullanılabilirliğini etkileyebilecek olan maddelerin test edilmesi için, anlatılan süreçte birtakım değişiklikler gerekebilir (örn. kapalı sistem, test küvetinin şartlarının değiştirilmesi). Bazı uygun değişiklikler üzerine kılavuz (2), (3) ve (4) içerisinde verilmektedir.

1.4. Testin ilkesi

Bu testin amacı, maddenin tatlı su mikroalginin ve/veya siyanobakterinin büyümesi üzerine etkilerini belirlemektir. Üssel büyüyen test organizmaları, normal olarak 72 saat boyunca seri kültürdeki test maddesine maruz bırakılır. Oldukça kısa test süresine rağmen birçok nesil üzerinde etkiler değerlendirilebilir.

Sistem tepkisi, test maddesinin değişik konsantrasyonlarına maruz bırakılmış su yosunu serilerindeki büyümenin azalmasıdır. Tepki, kontrol kültürlerine maruz bırakılmamış tekrarların ortalama büyümelerine kıyasla maruz kalma konsantrasyonunun fonksiyonu olarak değerlendirilir. Toksik etkilere sistem tepkisinin tam ifadesi için (optimum hassasiyet), kültürlerin yeterli besin koşulları ve zaman aralığında sürekli ışık altında sınırlandırılmamış üssel büyümesine izin verilerekbelirli büyüme hızı ölçülür.

Büyüme ve büyümenin engellenmesi, zaman fonksiyonu olarak su yosunu biyokütlesinin ölçümleriyle niceliklendirilir. Su yosunu biyokütlesi, hacim başına kuru ağırlık olarak tanımlanır, örneğin mg alg/litre test çözeltisi. Bununla birlikte kuru ağırlığı ölçmek zordur ve bu sebeple vekil parametreler kullanılır. Diğer vekil parametreler, hücre hacmi, floresans, optik yoğunluk ve benzerlerini içerir. Ölçülmüş vekil parametre ile biyokütle arasındaki

çevirme faktörü bilinmelidir.

Test sonlanma noktası, maruz kalma sürecinde biyokütledeki (ortalama büyüme hızı) logaritmik artış olarak ifade edilen büyüme engellenmesidir. Testlerde kaydedilmiş olan belirli büyüme hızlarından, %x yavaşlama ile sonuçlanan konsantrasyon belirlenir (örneğin %50)hızve E_rC_x (e.g. E_rC_{50}) olarak ifade edilir.

Bu yöntemin uygulanması için sonuçların hesaplanması, aşağıda bölüm 2.2 içerisinde açıklanan sonuçlardan dolayı ortalama büyüme hızına dayanmalıdır. Bu test yöntemi içerisinde kullanılan değişebilir ek tepki verimdir, bu konu ile ilgili olarak bazı ülkelerdeki belirlidüzenleyici gereksinimleri yerine getirmek gerekebilir. Verim, maruz kalma başlangıcındaki biyokütle ilemaruz kalma bitimindeki biyokütle arasındaki fark olarak tanımlanmıştır. Testlerde kaydedilen verimden, verimin yaklaşık olarak belirlenmiş %x yavaşlamaya (örn. %50) sebep olan konsantrasyon hesaplanır ve E_yC_x (örn. E_yC_{50}) olarak üretilir.

Ek olarak, LOEC ve NOEC istatiksel olarak belirlenebilir.

1.5. Test maddesi hakkında bilgi

Test koşullarının oluşturulmasında faydalı olabilecek olan test maddesi hakkında bilgi, yapısal formülü, ışıktaki kararlılığı, test koşulları altındaki kararlılığı, ışık absorpsiyon özelliklerini, pKa ve sudaki biyobozunabilirliği içeren dönüşüm çalışmalarının sonuçlarını içerir.

Suda çözünürlük, oktanol su dağılım katsayısı (P_{ow}) ve test maddesinin buhar basıncı bilinmeli ve rapor edilmiş olan iyileştirme etkinliği ile test çözeltisi içerisindeki madde niceliklendirme için geçerliliği kabul edilmiş olan yöntem ve tespit limiti kullanılabilir olmalıdır.

1.6. Referans madde

Uluslararası onay testinde kullanılan 3,5 diklorofenol gibi referans madde(ler), test prosedürü kontrolü aracı olarak kullanılabilir. Potasyum dikromat, yeşil alg için referans madde olarak kullanılabilir. Referans maddesinin yılda en az iki kez test edilmesi makbuldür.

1.7. Testin geçerliliği

Testin geçerli olarak kabul edilmesi için, aşağıdaki performans ölçütlerini karşılaması gerekmektedir:

Kontrol kültürlerindeki biyokütle, 72 saatlik test süresi içerisinde en az 16 kat artmış olmalıdır. Bu, 0,92 $gün^{-1}$belirli büyüme hızına denk gelir. En sık kullanılan türler için, büyüme hızı genellikle çok yüksektir (bakınız Ek-I). Bu değerlendirme ölçütü, Ek-I'de listelenmiş olan daha yavaş büyüme hızına sahip türler olduğunda karşılanamayabilir. Bu durumda, test süresi boyunca büyümenin üssel olmasını sağlamak için kontrol kültürlerindeki test süresi en az 16 kat büyüme elde edilene kadar uzatılmalıdır. Test esnasında limitsiz üssel büyümeyi elde etmek için minimum çarpım katsayısının 16 olması kaydıyla test süresi en az 48 saate indirilebilir.

Kontrol kültürlerinde (bakınız 'değişkenlik katsayısı', bölüm 1.2) bölüm başına belirlibüyüme

hızı (0-1, 1-2 ve 2-3 gün, 72- saatlik testler için) için değişkenlik katsayısının ortalaması %35'i geçmemelidir. Bölüm başına belirli büyüme hızının hesaplanması için bölüm 2.2.1'deki ikinci paragrafa bakınız. Bu değerlendirme ölçütü, tekrar kontrol kültürleri için hesaplanmış olan varyasyon katsayısının ortalama değerine uygulanır.

Kontrol kültürlerindeki testin tamamı boyunca ortalama büyüme hızının varyasyon katsayısı, *Pseudokirchneriellasubcapitata*ve *Desmodesmussubspicatus* ile testler içerisinde %7'yi geçmemelidir. Daha az sıklıkta test edilen diğer türler için, bu değer %10'unu geçmemelidir.

1.8. Yöntemin tanımı

1.8.1. Düzenekler

Test çözeltisi ile temas edecek olan test kapları ve diğer düzenekler tamamen camdan ya da diğer kimyasal olarak inert malzemelerden yapılmış olmalıdır. Test çözeltisinin bileşimini veya alg büyümesini etkileyecek organik veya inorganik kirleticilerin karışmasını önlemek için bu malzemeler yıkanmalıdır.

Test kapları, test esnasında ölçümler için yeterli hacimde kültüre ve atmosferden yeterli kütlede CO_2 transferine izin veren normal cam şişe boyutlarında olacaktır (bakınız bölüm 1.8.9, ikinci paragraf). Analitik tayinler için yeterli olması gereken sıvı hacmine dikkat edilir (bakınız bölüm 1.8.11, beşinci paragraf).

Buna ilaveten, aşağıdaki malzemelerin bazıları ya da tamamı gerekecektir:

— Kültür düzeneği: seçilen inkübasyon sıcaklığının ± 2 °C'de korunduğu etajer ya da hazne tavsiye edilir.

— Işık ölçüm aygıtları: ışık kuvvetinin ölçüm yönteminin ve özellikle alıcı tipinin (kollektör) ölçülen değeri etkileyeceğini dikkate almak önemlidir. Ölçümler, tercihen küresel (4 π) alıcı (ölçüm düzleminin üstünde ve altındaki bütün açılardan direkt ya da yansıtılan ışığa tepki gösterir) ya da 2 π alıcı (ölçüm düzleminin üstündeki bütün açılardan ışığa tepki gösterir) kullanılarak yapılacaktır.

— Alg biyokütlesini belirlemek için düzenekler. Alg biyokütlesi için en sık kullanılan vekil parametre olan hücre sayımı; elektronik tane sayacı, sayma hazneli mikroskop ya da akışlı hücre ölçer kullanarak yapılabilir. Diğer biyokütle vekilleri; akışlı hücre ölçer, florimetre, spektrofotometre ya da renk ölçer kullanarak ölçülebilir. Hücre sayımını kuru ağırlık ile ilişkilendiren çevrim faktörü hesaplama yapmak için kullanışlıdır. Spektrofotometre kullanırken düşük biyokütlekonsantrasyonlarında kullanışlı ölçümler yapılmasını sağlamak için en az 4 cm ışık yoluna sahip küvetleri kullanmak gerekebilir.

1.8.2. Test organizmaları

Birçok iliştirilmemiş mikroalg ve siyanobakteri türü kullanılabilir. Ek-I'de listelenmiş olan suşların, Test Yöntemi içerisinde belirlenmiş olan test prosedürünü kullanarak uygun olabilecekleri gösterilmiştir.

Eğer diğer türler kullanılır ise, suş ve/veya köken rapor edilmelidir. Seçilmiş test alginin üssel büyümesinin, genel koşullar altında test süresi boyunca elde edilebileceği teyit edilmelidir.

1.8.3. Büyüme ortamı

İki alternatif büyüme ortamı, OECD veya AAP ortamı tavsiye edilir. Bu ortamların bileşimleri, Ek-II içerisinde gösterilmektedir. İki ortamın başlangıç pH değeri ve tampon kapasitesinin farklı olduğu dikkat alınmalıdır. Buna bağlı olarak testlerin sonuçları, iyonlaştırıcı maddeler test edilirken kullanılan ortama bağlı olarak değişebilir.

Büyüme ortamının modifikasyonu, belirli amaçlar için gerekli olabilir, örneğin farklı pH değerlerinde test etme veya metalleri ve şelatlama ajanlarını test etme. Modifiye edilmiş ortamın kullanımı detaylı bir şekilde tanımlanmalı ve gerekçelendirilmelidir (3), (4).

1.8.4. Başlangıç biyokütle konsantrasyonu

Test kültürlerindeki başlangıç biyokütle, bütün test kültürlerinde aynı olmalı ve besin azalması riski olmaksızın inkübasyon süresi boyunca üssel büyümeye izin vermek için yeterli düzeyde düşük olmalıdır. Aşağıdaki başlangıç hücre konsantrasyonları tavsiye edilir:

Pseudokirchneriellasubcapitata	5×10^3-10^4	hücre/ml
Desmodesmussubspicatus	2-5 $\times 10^3$	hücre/ml
Naviculapelliculosa	10^4	hücre/ml
Anabaenaflos-aquae	10^4	hücre/ml
Synechococcusleopoliensis	5×10^4-10^5	hücre/ml

1.8.5. Test maddesi konsantrasyonu

Etki oluşması muhtemel konsantrasyon aralığını belirlemek için aralık bulma testlerinin sonuçları baz alınabilir. Kesin final testi için 3,2'yi aşmayan bir çarpan ile geometrik serilerde düzenlenmiş en az beş konsantrasyon seçilmelidir. Konsantrasyon tepki eğrisi düz olan test maddeleri için daha yüksek bir çarpan gerekçelendirilebilir. Konsantrasyon serileri, tercihen alg büyüme hızının %5- 75 engellenmesine neden olan aralığı kapsamalıdır.

1.8.6. Eşlemeler ve kontroller

Test tasarımı, her test konsantrasyonunda üç tekrar içermelidir. Eğer NOEC tayinine gereksinim yoksa konsantrasyon miktarını arttırmak ve her konsantrasyon için tekrar sayısını azaltmak üzere test tasarımı değiştirilebilir. Kontrol tekrarlarının sayısı en az üç olmalıdır ve tercihen her test konsantrasyonu için kullanılan tekrar miktarının iki katı olmalıdır.

Test maddesi konsantrasyonlarının analitik tayini için ayrı test çözelti grubu hazırlanabilir (bakınız bölüm 1.8.11, dördüncü ve altıncı paragraf).

Test maddesini çözündürmek için bir çözücü kullanıldığında, test tasarımı, test kültürlerinde kullanılan aynı konsantrasyonlarda çözücü içeren ek kontrolleri de içermelidir.

1.8.7. Aşı kültürünün hazırlanması

Test edilecek algin, test koşullarına uymasını sağlamak ve test çözeltilerine aşılarken üssel büyüme fazında olduğunu temin etmek amacıyla, test ortamındaki aşı kültürü, testin

başlangıcından 2-4 günönce hazırlanır. Test başlangıcına kadar aşıkültüründe etkili olması için üssel büyümeye izin vermek amacıyla alg biyokütlesi ayarlanmalıdır. Aşı kültürü, test kültürleri gibi aynı koşullarda inkübe edilecektir. Kültür koşulları altında test suşlarının büyümesinin normal aralık içerisinde olmasını sağlamak için aşı kültüründe biyokütledeki artış ölçülür. Örnek alg kültürleme prosedürü, Ek-III içerisinde tanımlanmaktadır. Test esnasında eş zamanlı hücre bölünmesinden kaçınmak için aşı kültüründe ikinci üretme (propagasyon) adımına gerek duyulabilir.

1.8.8. Test çözeltilerinin hazırlanması

Bütün test çözeltileri, aynı konsantrasyondaki büyüme ortamını ve aynı başlangıç test algi biyokütlesini içermelidir. Seçilen konsantrasyonların çözeltileri, genellikle büyüme ortamı ve aşı kültür ile test maddesinin stok çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlanır. Stok çözeltileri normal olarak test ortamında test maddesini eriterek hazırlanır.

Aseton, t-butil alkol ve dimetilformamit gibi çözücüler, test ortamına su çözünürlüğü düşük olan maddeleri eklemek için taşıyıcı olarak kullanılabilir (2), (3). Çözücü konsantrasyonu, 100 µl/l'yi geçmemeli ve test serilerindeki bütün kültürlere (kontroller dahil) eklenmelidir.

1.8.9. İnkübasyon

Test kapları hava geçiren kapaklar ile kapatılır. Kaplar çalkalanır ve kültür düzeneğinin içine yerleştirilir. Test esnasında süspansiyon içerisindeki algi korumak ve CO_2 transferini kolaylaştırmak önemlidir. Bu amaçla sabit çalkalama ve karıştırma kullanılmalıdır. Kültürler, ± 2°C'de kontrol edilen 21 ila 24°C aralığındaki sıcaklıkta muhafaza edilmelidir. Tropikal türler gibi Ek-I'de listelenmiş olanlar haricindeki türler için geçerlilik kriterlerini tamamlayabilme şartıyla daha yüksek sıcaklıklar uygun olabilir. Şişelerin inkübatör içerisine rastgele yerleştirilmesi ve hergün yerlerinin değiştirilmesi tavsiye edilir.

Kontrol ortamı pH'ı, test esnasında 1,5 birimden daha fazla artmamalıdır. Test pH'ına yakın pH derecesindekısmen iyonlaşan metal ve bileşikler için tekrarlanabilir ve iyi tanımlanmış sonuçlar elde etmek amacıyla pH seviyesini sınırlamak gerekli olabilir. < 0,5 pH birimleri akımı teknik olarak uygulanabilirdir ve ortamdan test çözeltisine yeterli oranda transfer edilen CO_2 kütlesi ile erişilebilir, örneğin çalkalama oranını arttırarak. Başlangıç biyokütlesini ya da test süresini azaltarak CO_2 ihtiyacını azaltmak diğer olasılıktır.

Kültürlerin inkübe edildiği yüzey, sürekli ve eşit miktarda ('soğuk beyaz' veya 'günışığı' tipi) floresan aydınlatma almalıdır. Alg ve siyanobakterisuşlarının ışık gereksinimleri çeşitlilik gösterir. Işık yoğunluğu kullanılan test organizmasına göre seçilmelidir. Tavsiye edilen yeşil alg türleri için test çözeltilerindeki ışık yoğunluğu uygun bir alıcı kullanılarak ölçüldüğünde fotosentez için etkili olan 400-700 nm dalga boyu aralığındaki 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ aralığından seçilecektir. Özellikle *Anabaenaflos-aquae* gibi bazı türler düşük ışık yoğunluğunda iyi yetişir ve yüksek yoğunlukta zarar görebilir. Buna benzer türler için ortalama ışık yoğunluğu 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$aralığından seçilmelidir. (Tavsiye edilen ışık yoğunluğu olan 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ değeri, Lüks olarak kalibre edilmiş ışık ölçüm aygıtlarında soğuk beyaz ışık için yaklaşık olarak 4440-8880 lüks/ışık aralığına denk gelir.). Işık yoğunluğu, inkübasyon alanı üzerindeki ortalama ışık yoğunluğundan ± %15'ten daha fazla çeşitlenmeyecektir.

1.8.10. Test süreci

Test süreci normal olarak 72 saattir. Bununla birlikte, bölüm 1.7'de bütün geçerlilik kriterlerini sağlaması kaydıyla daha kısa ya da uzun test süreçleri kullanılabilir.

1.8.11. Ölçümler ve analitik tayinler

Her cam şişe içerisindeki alg biyokütlesi, test süresi esnasında en az günlük olarak belirlenir. Eğer ölçümler, test çözeltisinden pipetle çıkarılan küçük hacimler üzerinde yapılır ise bunlar değiştirilmemelidir.

Biyokütle ölçümü, mikroskop ya da elektronik tane sayacıyla (hücre sayımı ve/veya biyohacim) elle hücre sayımı yapılarak gerçekleştirilir. Sitometri, in vitro veya in vivo klorofil floresans (6) (7) ya da optik yoğunluk gibi alternatif teknikler, test içinde oluşan biyokütle aralığı üzerinde gösterilebilecek olan biyokütle ile yeterli korelasyon sağlayarak kullanılabilir.

Çözeltilerin pH'ı, testin başlangıcında ve bitiminde ölçülür.

Kullanılan konsantrasyon aralığındaki test maddesinin tayini için sağlanmış analitik prosedür uygunsa, başlangıç konsantrasyonlarını doğrulamak ve test esnasındaki maruz kalma konsantrasyonlarının muhafazası için test çözeltileri analiz edilmelidir.

Düşük ve yüksek test konsantrasyonu testinin başlangıç ve bitiminde test maddesi konsantrasyonunun ve beklenen EC_{50} düzeyi etrafındaki konsantrasyonunun analizi, maruz kalma konsantrasyonunun test esnasında nominal değerlerden %20 daha az çeşitlendireceği muhtemel olduğu yerde yeterlidir. Testin başlangıcı ve bitimindeki bütün test konsantrasyonlarının analizi, nominalin muhtemelen %80-120 içerisinde kalamayacağı konsantrasyonlarda tavsiye edilir. Uçucu, stabil olmayan ya da kuvvetlice adsorbe eden test maddeleri için test maddesi kaybını daha iyi tanımlamak amacıyla maruz kalma esnasında 24 saatlik aralıkta analiz etmek için ek numune alma tavsiye edilir. Bu maddeler için fazla tekrarlara ihtiyaç duyulabilir. Her durumda test maddesi konsantrasyonlarının, sadece her test konsantrasyonunda bir tekrar kabı üzerinde uygulanmasına ihtiyaç vardır (ya da tekrar ile toplanmış kapların içeriğinde).

Test esnasında maruz kalma konsantrasyonlarının analizi için özel olarak hazırlanmış test ortamı, test için kullanılanlara aynı şekilde muamele edilmelidir, örneğin alg ile inoküle edilmelidirler ve özdeş koşullar altında inkübe edilmelidir. Eğer çözündürülmüş test maddesi konsantrasyonunun analizi gerekir ise, algi ortamdan ayırmak gerekli olabilir. Ayırma işlemi, algin gerektiği kadar çökelmesi için tercihen düşük g-kuvvetindeki santrifüjle yapılmalıdır.

Test edilen madde konsantrasyonunun nominalin ± %20'si içerisinde tatmin edici olarak muhafaza edildiğine ve test yoluyla başlangıç konsantrasyonun ölçüldüğüne dair kanıt var ise sonuçların analizi nominale ya da ölçülmüş başlangıç değerlere dayanabilir. Eğer nominalden ya da ölçülmüş başlangıç konsantrasyondan sapma, sonuçların analizinden ± %20 daha büyük ise sonuçların analizi maruz kalma esnasında geometrik ortalama konsantrasyonuna ya da test maddesi konsantrasyonunun sapmasını açıklayan modellere (3) (8) dayanır.

Alg büyüme yavaşlatma testi, diğer kısa dönem sucul toksisite testlerinden daha dinamik bir test sistemidir. Bunun sonucu olarak özellikle düşük konsantrasyonlarda test edilmiş adsorbe edici maddeler için asıl maruz kalma konsantrasyonlarının belirlenmesi zor olabilir. Bu gibi

durumlarda çözeltideki maddenin artan alg biyokütlesineadsorpsiyon yoluyla dâhil olması, test sisteminden kaybolması anlamına gelmez. Test sonuçları analiz edildiğinde, büyüme yavaşlatmasinde azalmayla seyreden test aşamasında test maddesi konsantrasyonunazalıp azalmadığı kontrol edilmelidir. Böyle bir durumda test maddesi konsantrasyonunun (8) sapmasını tanımlayan uygun model uygulaması dikkate alınabilir. Aksi takdirde başlangıç (nominal ya da ölçülmüş) konsantrasyonlarda sonuçların analizini temel almak uygun olabilir.

1.8.12. Diğer gözlemler

Mikroskobik gözlem, normal ve sağlıklı bir aşı kültürün görünümünü doğrulamak ve test bitiminde herhangi bir anormal alg görünümünü gözlemlemek için uygulanmalıdır.

1.8.13. Sınır testi

Bazı koşullar altında, örneğin öncül testlerde, test maddesinin 100 $mg \cdot l^{-1}$ kadar ya da test ortamındaki (hangisi daha düşük ise) kendi çözünürlük limitine kadar olan konsantrasyonlarda toksik etki olmadığını belirttiğinde, kontrol grubu veya bir doz grubunu (100 $mg \cdot l^{-1}$ ya da çözünürlük limitine eşit olan konsantrasyon) kapsayan sınır test üstlenilebilir. Bunun, maruz kalma konsantrasyonunun analiziyle desteklenmesi şiddetle tavsiye edilir. Doz tekrarlarının sayısının altı olması hariç sınır testine önceden tanımlanmış bütün test koşulları ve geçerlilik kriterleri uygulanır. Kontrol ve doz gruplarındaki tepki değişkenleri, ortalamaları karşılaştırmak için istatistiksel test kullanarak analiz edilebilir, örneğin Tek anakütle ortalaması için parametrik hipotez sınaması (Student's t-test). Eğer iki grubun varyansları eşit değil ise, eşit olmayan varyanslar için ayarlanmış t-test uygulanmalıdır.

1.8.14. Güçlü renkli maddeler için modifikasyonlar

İrradiyasyon (ışık yoğunluğu) bu Test Yönteminde belirtilen aralığın en yüksek bitiminde olmalıdır: 120µE m^{-2} s^{-1} ya da daha yüksek.

Işık yolu, test çözeltisinin hacminin azaltılmasıyla kısaltılmalıdır (5-25 ml aralıkta).

Kültür yüzeyinde alglerin yüksek irradiyasyona maruz kalmasını sağlamak için yeterli uyarma (örnek olarak ölçülü çalkalama) uygulanmalıdır.

2. VERİ

2.1. Büyüme eğrilerinin çizimi

Test kaplarındaki biyokütle, ölçüm için kullanılan vekil parametre birimleri cinsinden ifade edilebilir(örneğin hücre sayısı, floresan).

Test materyali konsantrasyonları ve ölçüm zamanları ile birlikte test kültürleri ve kontrollerindeki tahmin edilen biyokütle tablo haline getirilir ve büyüme eğrilerini çizmek için en az her saat başındaki çözünürlük kaydedilir. Hem logaritmik ölçek hem de doğrusal ölçek ilk adımda kullanışlı olabilir, fakat logaritmik ölçekler şart olup genellikle test süresi esnasındaki büyüme şeklinde varyasyonları daha iyi gösterir. Üssel büyümenin, logaritmik

ölçek üzerinde çizildiğinde bir doğru ürettiği ve doğrunun eğiminin belirli büyüme hızını belirlediği dikkate alınır.

Çizimleri kullanarak, kontrol kültürlerinin test yoluyla beklenen oranda üssel olarak büyüyüp büyümediği tetkik edilir. Bütün veri noktaları ve grafik görünümü dikkatlice tetkik edilir ve olası hatalar için işlenmemiş veri ve prosedür kontrol edilir. Sistematik bir hatayla sapmaya neden olmuş gibi görünen herhangi bir veri noktası özellikle kontrol edilir. Eğer yönetsel hataların belirtilebildiği ve/veya yüksek olasılıkla dikkate alındığı belli ise spesifik veri noktası anahat düzenleyicisi olarak işaretlenir ve sonraki istatiksel analize dahil edilmez(iki ya da üç tekrar kabından birindeki sıfır alg konsantrasyonun sebebi, doğru bir şekilde inoküle edilmemiş ya da düzgün bir şekilde temizlenmemiş kap olabilir). Ana hat düzenleyicisi olarak veri noktasının red nedenleri test raporunda açık bir şekilde belirtilmelidir. Kabul edilen nedenler sadece (ender) prosedürel hatalardır ve kötü hassasiyet değildir. Ana hat düzenleyicisinin belirlenmesinde kullanılan istatistiksel prosedürler bu tip problemlerde kısıtlı olarak işe yarar ve uzman değerlendirmesinin yerini alamaz. Verinin grafiksel veya tablo olarak sunulduğu durumlarda ana hat düzenleyicilerinin de veri noktaları arasında (anahat düzenleyicisi olarak işaretlenmiş biçimde)gösterilmesi tercih edilir.

2.2. Tepki değişkenleri

Testin amacı alg büyümesindeki etkileri belirlemektir. Bu Test Yöntemi, iki farklı tepki değişkenini tanımlar. Ülkemizde kabul edilebilir sonuçlar için, etkiler yukarıda tanımlanan (a) ve (b) tepki değişkenleri kullanarak değerlendirilir.

a) Ortalama büyüme hızı: bu tepki değişkeni, test esnasında her gün üretilen biyokütlenin logaritmik artışına dayanılarak hesaplanır.
b) Verim: bu tepki değişkeni, test sonundaki biyokütle ile başlangıç biyokütlesi değerleri arasındaki farktır.

Bu test yönteminin uygulanması için, sonuçların hesaplanması, yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı ortalama büyüme hızına dayandırılmalıdır. Bu iki tepki değişkenini kullanarak hesaplanan toksisite değerlerinin mukayese edilebilir olmadığı ve test sonuçları kullanıldığında bu farklılığın kabul edilmesi gerektiğine dikkat edilmelidir. Bu test yöntemindeki test koşullarına bağlı kalındığında, ortalama büyüme hızı üzerine dayalı olan EC_x değerleri, genel olarak verim (E_yC_x) üzerine dayalı sonuçlardan daha yüksek olacaktır. Bunun sebebi söz konusu yaklaşımlarda kullanılan matematiksel temeldir. Bundan dolayı, sadece matematiksel olarak farklı olan değerlerde iki tepki değişkeni arasında hassasiyet yönünden farklılık olduğu şeklinde yorumlanmamalıdır. Ortalama büyüme hızı kavramı, toksisitenin, büyüme hızına etkisine dayanarak tahmin edildiği ve kontrol grubunun tam belirli büyüme hızı veya konsantrasyon-tepki eğrisinin eğimi veya test süresinden bağımsız olduğu sınırlanmamış kültürlerdeki alglerin genel üssel büyüme biçimine dayanır. Bunun tam tersi olarak, verim tepki değişkenine bağlı olan sonuçlar diğer değişkenlerin tümüne bağlıdır. E_yC_x, testlerde kullanılan alg türlerine özgü büyüme hızına ve türler arası ve hatta farklı alg suşları arasında değişiklik gösterebilen maksimum spesifik büyüme hızına bağlıdır. Bu tepki değişkeni, alg türleri ya da farklı alg suşlarının toksik maddeye olan hassasiyetlerini karşılaştırmak için kullanılmamalıdır. Toksisite tahmini için ortalama büyüme hızı kullanımı bilimsel olarak tercih edilirken, bazı mevzuat gereklerini yerine getirmek amacıyla verime dayalı toksisite tahmini de bu Test Yöntemine dahil edilmiştir.

2.2.1. Ortalama Büyüme Hızı

Belirli bir süre için ortalama büyüme hızı, kontrol ve doz gruplarının her tek kabı için denklemden biyokütledeki logaritmik artış olarak hesaplanır:

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

Burada,

μ_{i-j}: Zaman *i* den *j*'ye ortalama büyüme hızı

X_i: Zaman *i*'de biyokütle

X_j: Zaman *j*'de biyokütle

Her doz ve kontrol grubu için, varyans tahminleri ile birlikte büyüme hızı için ortalama değer hesaplanır.

Başlangıç değeri olarak, ölçülmüş değerden ziyade nominal olarak inoküle edilmiş biyokütle değerini kullanarak bütün test süresi (normal olarak 0-3 gün) üzerinde ortalama büyüme hızını hesaplanır çünkü bu yolla çok daha hassas sonuçlar elde edilecektir. Biyokütle ölçümü için kullanılan ekipman(örneğin, akışlı hücre ölçer), düşük aşı biyokütleyi yeterli hassasiyet derecesinde tespit edebilirse başlangıç biyokütle konsantrasyonu kullanılabilir. Test süresince gün başına (0-1, 1-2 ve 2-3 gün) belirli büyüme hızı olarak hesaplanan bölüm büyüme hızı değerlendirilir ve kontrolün büyüme hızının sabit kalıp kalmadığı incelenir (bakınız geçerlilik kriteri, bölüm 1.7). Birinci günün belirli büyüme hızının toplamdaki ortalama büyüme hızından belirgin bir şekilde düşük olması, gecikme evresine işaret edebilir. Kontrol kültürlerinde gecikme evresi, ön-kültürün uygun üretimi ile azaltılabilir ve neredeyse tamamen yok edilebilirken, maruz bırakılan kültürlerde ilk maruz kalmadan sonra gerçekleşen gecikme evresinin sebebi, ilk toksik stresin aşılması veya test maddesinin kaybına bağlı (alg biyokütlesi üzerine emilim dahil) daha kısa süreli maruz kalma olabilir. Bundan dolayı, test maddesinin maruz kalma süresi boyunca yaptığı etkileri değerlendirmek için bölüm büyüme hızına bakılabilir. Bölüm büyüme hızı ile ortalama büyüme hızı arasındaki belirgin farklar sabit logaritmik büyümeden sapmaya işaret eder ve büyüme eğrilerinin daha dikkatli incelenmesini gerektirir.

Her doz tekrarı için büyüme hızı yavaşlatma yüzdesi aşağıdaki denklemden hesaplanır:

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

Burada:

$\%I_r$: Ortalama büyüme hızında yavaşlatma yüzdesi;

μ_C: Kontrol grubunda ortalama büyüme hızı (μ) için ortalama değer;

μ_T: Doz tekrarı için ortalama büyüme hızı.

Test çözeltilerini hazırlamak için çözücü kullanılırsa, yüzde yavaşlatma hesaplanırken, çözücüiçermeyen kontrollerden ziyade çözücü içeren kontroller kullanılmalıdır.

2.2.2. Verim

Verim, kontrol ve dozların her kabı için test bitimindeki biyokütleden başlangıç biyokütlesi çıkartılarak hesaplanır. Her test konsantrasyonu ve kontrolü için, varyans tahminler ile birlikte verim için ortalama değer hesaplanır. Verimdeki ($\%I_y$) yavaşlama yüzdesi, her doz tekrarı için aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100$$

Burada:

$\%I_y$: Verim yavaşlatma yüzdesi;

Y_C: kontrol grubundaki verim için ortalama değer;

Y_T: işlem tekrarı için verim değeri.

2.3. Konsantrasyon-Tepki Eğrisinin Çizimi

Test maddesi konsantrasyonunun logaritmasına karşı yavaşlama yüzdesi çizilir ve noktalar dikkatlice incelenir, ilk aşamada harici olarak belirlenen bütün veri noktaları göz ardı edilir. Konsantrasyon tepki ilişkisinin ilk izlenimini elde etmek için göz ya da bilgisayar çıkarımı yoluyla veri noktaları boyunca düz bir hat uydurulur daha sonra tercihen bilgisayarlı istatistik yöntemi gibi daha detaylı bir yöntem ile devam edilir. Veri analiz araçlarının kullanılabilirliğine, planlanan veri kullanımına, veri kalitesine (tamlık) ve miktarına bağlı olarak (ve bazen iyi gerekçelendirilerek) bu etapta veri analizini durdurmaya karar verilebilir ve elde edilen eğriden anahtar değerler olan EC_{50} ve EC_{10} (ve/veya EC_{20}) okunur (uyarıcı (stimulator) etkiler ile ilgili bölüme bakınız.). İstatistiksel yöntem kullanmamak için geçerli nedenler şunları içerebilir:

— Bilgisayarlı yöntemlerle elde edilen sonuçlar bazen güvenilir olmayabilir, bu gibi durumlarda uzman görüşü alınır
— mevcut bilgisayar programlarının uyarıcı büyüme tepkilerini kullanmak için yeterli olmaması (aşağı bakınız).

2.4. İstatiksel prosedürler

Amaç, bağlanım (regresyon) analiziyle sayısal konsantrasyon–tepki ilişkisi elde etmektir. Tepki verisini doğrusallaştırarak probit, logit veya Weibull gibi birimlereçevirdikten sonra ağırlıklıdoğrusal bağlanım kullanmak mümkündür fakat doğrusal olmayan regresyon prosedürleri tercih edilir çünkü bu prosedürler,verilerde mutlaka ortaya çıkacak düzensizlikleri ve düzgün dağılımdan sapmaları daha iyi yönetirler. Sıfır ya da tam yavaşlamaya yaklaşıldığı durumlarda, bu gibi düzensizlikler, çevrim ile oldukça büyüyerek, yapılan analizi karıştırırlar(9). Probit, logit ya da Weibull çevrimleri kullanan standart analiz yöntemlerinin var-yok verisi (ör. ölüm ya da canlı kalma) kullanımı için ayırıldığına ve

büyüme veya biyokütle verisini temin etmek için değiştirilmesi gerektiğine dikkat edilmelidir. Devamlı veriden EC_x değerlerinin tayini için belirli prosedürler (10), (11) ve (12)'de bulunabilir. Doğrusal olmayan bağlanım analizi kullanımı, Ek-IV içerisinde detaylı bir şekilde gösterilmektedir.

Analiz edilecek olan her tepki değişkeni için, EC_x değerlerinin nokta tahminini yapmak amacıyla konsantrasyon-tepki ilişkisi kullanılır. Mümkün olduğunda her tahmin için %95 güvensınırı belirlenmelidir. Tepki verisinin bağlanım modeline uygunluğu, grafiksel veya istatistiksel olarak değerlendirilmelidir. Bağlanım analizinde, doz gruplarının ortalaması kullanılmaz; bunun yerine, her bir tekrardaki tepkiler kullanılarak yürütülür. Bununla birlikte, eğer veri içinde dağılım çok büyük olduğundan dolayı doğrusal olmayan eğriçizimi zor olur ya da başarısız olur ise şüpheli harici veri noktalarının etkisini azaltmanın pratik yolu olarak grup ortalamalarında bağlanım yürütülerek problem aşılabilir. Bu şekilde kullanım tercih edilirse, normal prosedürden bir sapma olarak test raporunda belirtilmelidir çünkü tekrar verilerinden çizilen eğri iyi sonuçlar vermez.

Mevcut bağlanım modelleri, veri için uygun değil ise EC_{50} tahminleri ve güven sınırları, ön yükleme ile doğrusal içdeğerbiçim kullanarak elde edilebilir (13).

LOEC ve dolayısıyla NOEC'i tahmin etmek ve test maddesinin büyüme hızı üzerine etkilerini bulmak için varyans (ANOVA) teknikleri analizini kullanarak doz ortalamalarını karşılaştırmak gerekir. Daha sonra her konsantrasyonun ortalaması, uygun olan çoklu karşılaştırma ya da eğilim (trend) test yöntemi kullanarak kontrol ortalaması ile karşılaştırılmalıdır. Dunnett ya da Williams testleri kullanışlı olabilir (14)(15)(16)(17)(18). Varyans homojenliğinin ANOVA varsayımının devam edip etmediğini değerlendirmek gereklidir. Bu değerlendirme, grafiksel olarak ya da geçerli bir test ile yapılabilir (18). Uygun testler Levene ya da Barlett'dir. Varyans homojenliği varsayımını sağlamakta başarılı olunamadığı durumlarda bazen logaritmik veri dönüşümü işe yarayabilir. Eğer varyansheterojenliği çok büyük ve dönüşüm ile düzeltilemiyor ise düşüren Jonkheeretrend testi gibi yöntemler ile analiz belirlenmelidir. NOEC'in belirlenmesi üzerine ek kılavuz, (12) içerisinde bulunabilir.

Bilimdeki yeni gelişmeler, NOEC kavramından vazgeçmeyi ve yerine bağlanıma dayalı nokta tahmini EC_x'i kullanmayı tavsiye etmektedir. Bu alg testi kapsamında, x için uygun bir değer belirlenmemiştir. %10 ile %20 aralığında bir değer uygun olabilir (seçilen tepki değişkenine bağlı olarak) ve hem EC_{10}'un hem de EC_{20}'nin raporlanması tercih edilir.

2.5. Büyümenin uyarılması

Düşük konsantrasyonlarda, bazen, büyümenin uyarılması (negatif inhibisyon) gözlemlenebilir. Bu durum, hormesisden (toksik uyarı) ya da kullanılan minimal ortama test materyalleri ile uyarıcı büyüme faktörlerinin eklenmesinden kaynaklanabilir. İnorganik besinlerin eklenmesinin doğrudan herhangi bir etkisi bulunmaz çünkü test ortamındaki besin fazlalığı, test süresince muhafaza edilmelidir. Düşük dozlardaki uyarı miktarı, çok büyük olmadığı sürece, genellikle EC_{50} hesaplamalarında görmezden gelinir. Bununla birlikte uyarı çok büyükse veya EC_x değeri düşük x için hesaplanacaksa özel prosedürler gerekebilir. Mümkünse veri analizinden uyarıcı tepkilerin çıkarılmasından kaçınılmalıdır ve eğer mevcut eğrinin çizimi yazılımı küçük uyarı kabul edemiyor ise ön yükleme ile doğrusal iç değer biçim kullanılabilir. Eğer çok büyükse, hormesis modeli kullanımı kabul edilebilir (19).

2.6. Toksik olmayan büyüme yavaşlaması

Işık absorbe eden test materyalleri, büyüme hızının fazlaca azalmasına sebep olabilir çünkü gölgelendirme, uygun ışık miktarını azaltır. Bu tür fiziksel etki çeşitleri, test koşullarının değiştirilmesinden kaynaklanan toksik etkilerden ayrı tutulmalı ve ayrı rapor edilmelidir. Kılavuz, (2) ve (3) içinde bulunabilir.

3. RAPOR

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdakileri içermelidir:

Test Maddesi:
- Çözünürlük sınırı dahil ilgili fiziksel ve fizikokimyasal özellikler
- Saflık dahil kimyasal kimliği

Test suşları:
- Kullanılan suş, tedarikçisi veya kaynağı, kültür koşulları.

Test koşulları:

- Test başlangıç tarihi ve süresi,
- Test tasarımının açıklaması: test kapları, kültür hacimleri, test başlangıcındaki biyokütle yoğunluğu
- Ortam bileşimi,
- Test konsantrasyonları ve tekrarları (örneğin kullanılan tekrar sayısı, test konsantrasyonlarının sayısı ve kullanılan geometrik dizi)
- Test çözelti hazırlama tarifi (çözücü kullanımı, vb.dahil)
- Kültür düzenekleri,
- Işık yoğunluğu ve kalitesi (kaynak, homojenlik)
- Sıcaklık
- Test edilmiş konsantrasyonlar: nominal test konsantrasyonları ve test kaplarındaki test maddesi konsantrasyonunu belirlemekte kullanılabilecek herhangi bir analiz sonucu. Yöntemin geri kazanım etkinliği ve test matriksi içindeki niteliklendirme sınırı rapor edilmelidir.
- Bu test yönteminden bütün sapmalar,
- Biyokütle tayini için yöntem ve ölçülen parametre ile kuru ağırlık arasındaki korelasyon kanıtı.

Sonuçlar:
- bütün muamelelerin, test başlangıç ve bitişindeki pH değerleri,
- her ölçüm noktasındaki her şişede biyokütle ve biyokütle ölçümü için kullanılan yöntem.
- Büyüme eğrileri (zamana karşı biyokütle çizimi)
- Tekrarlar için ortalama değerler ve değişkenlik katsayısı ile her doz tekrarı için hesaplanmış tepki değişkenleri,
- konsantrasyon-tepki ilişkisinin grafiksel gösterimi,

- EC50, EC10,EC20 vb. tepki değişkenleri için toksisite tahminleri ve ilgili güven aralıkları. LOEC ve NOEC hesaplandıysa, değerleri ve hesaplamada kullanılan istatistiksel yöntemler,
- Konsantrasyon-tepki ilişkisinin grafiksel gösterimi,
- ANOVA kullanılmış ise, tespit edilebilen etki boyutu (örn. en önemsiz farklılık)
- doz gruplarında gözlemlenen bütün uyarılar,
- alglerde meydana gelen morfolojik değişimler vb. gözlemlenen diğer bütün etkiler,
- sonuçların tartışılması, bu test yönteminden sapmanın test çıktıları üzerine olan bütün etkileri dahil.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD TG 201 (2006). Freshwater Alga andCyanobacteria, GrowthInhibition Test.

(2)ISO 1998: Waterquality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly solublematerials, volatile compounds, metals and wasterwater. ISO/DIS 14442.

(3) OECD 2000: GuidanceDocument on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

(5) ISO 1993: Wate rquality — Algal growth inhibition test. ISO 8692.

(6) Mayer, P.,Cuhel, R. andNyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibitiontests. WaterResearch 31: 2525-2531.

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology&Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925.

(8) Simpson, S.L.,Roland, M.G.E., Stauber, J.L. andBatley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay end points. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

(9) Christensen, E.R.,Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S.,Kusk, K.O. andChristensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(11) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

(12) OECD. (2004). GuidanceDocument on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronictoxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J.Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

(15) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(16) Williams, D.A. (1971). A test fordifferencesbetweentreatment means when several dose levels are comparedwith a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(17) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics28:510-531.

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P. AndCousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at lowdoses. WeedResearch, 29, 93-96.

Ek-I

Test için uygun olduğu gösterilmiş suşlar

Yeşil Alg

— *Pseudokirchneriella subcapitata,* (önceden *Selenastrum capricornutum* olarak bilinen), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG
— *Desmodesmus subspicatus* (önceden *Scenedesmus subspicatus* olarak bilinen)86.81 SAG

Diyatomeler

— *Naviculapelliculosa*, UTEX 664

Siyanobakteri

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

Suşların kaynağı

Tavsiye edilen suşlar, tek alg kültürlerinde aşağıdaki koleksiyonlardan temin edilebilir (alfabetik sıraya göre):

ATCC: AmericanTypeCulture Collection
10801 UniversityBoulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
UNITED STATES

CCAP, Culture Collection of AlgaeandProtozoa
Institute of FreshwaterEcology,
WindermereLaboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria
LA22 0LP
UNITED KINGDOM

SAG: Collection of AlgalCultures
Inst. PlantPhysiology
University of Göttingen
NicholausbergerWeg 18
3400 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular andDevelopmentalBiology
School of BiologicalSciences
TheUniversity of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

Tavsiye edilen türlerin görünüm ve karakteristikleri

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Görünüm	Eğik, kıvrık tek hücreler	Oval, genellikle tek hücreler	Çubuk	Oval hücreler zinciri	Çubuk
Boy (L × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Hücre hacmi (µm^3/hücre)	40-60 ([1])	60-80 ([1])	40-50 ([1])	30-40 ([1])	2,5 ([2])
Hücre kuru ağırlığı (mg/hücre)	2-3 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	1-2 × 10^{-8}	2-3 × 10^{-9}
Büyüme hızı ([3]) (gün^{-1})	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

([1]) Elektronik tane sayacı ile ölçülen
([2]) Boydan hesaplanan
([3]) Yaklaşık olarak. 70 µE·m^{-2}·s^{-1} ve 21 °C ışık yoğunluğunda OECD ortamında en sık gözlemlenmiş

Tavsiye Edilen Türlerin Kültürü ve Kullanımı Hakkında Özel Tavsiyeler

*Pseudokirchneriellasubcapitata*ve*Desmodesmussubspicatus*

Bu yeşil algleri, çeşitli kültür ortamında elde etmek genellikle kolaydır. Uygun ortam hakkında bilgi kültür koleksiyonlarında mevcuttur. Hücreler normal olarak tek ve ayrı dururlar ve hücre yoğunluğu ölçümleri, elektronik tane sayacı ya da mikroskop kullanarak kolay bir şekilde yürütülebilir.

Anabaena flos-aquae

Stok kültürü korumak için çeşitli büyüme ortamları kullanılabilir. Özellikle dikkat edilmesi gereken, yenileme esnasında seri kültürün logaritmik büyüme fazını geçirmesini engellemektedir, çünkü bu noktada geri kazanım zor olur.

Anabaena flos-aquae, iç içe geçmiş hücre zincirlerinin birikimi şeklinde gelişir. Bu birikimin boyutu, kültür koşullarına göre çeşitlilik gösterir. Biyokütle tayini için mikroskop sayımı ya da elektronik tane sayacı kullanıldığında bu birikimleri parçalamak gerekli olabilir.

Farklı çıkan sayım sonuçlarını azaltmak amacıyla zincirleri parçalamak için alt numunelere sonikasyon uygulanabilir. Zincirleri daha kısa boyutlara parçalamak için gerekenden fazla sonikasyon hücreleri yok edebilir. Sonikasyon şiddeti ve süresi, her muamele için özdeş olmalıdır.

Değişkenliğin telafi edilmesine yardımcı olmak için hemositometrede yeterli alan (en az 400 hücre) hesaplanır. Bu, mikroskopik yoğunluk tayininin güvenirliliğini geliştirecektir.

Hücre zincirleri sonikasyonla dikkatlice parçalandıktan sonra elektronik tane sayacı ile toplam *Anabaena* hücre hacmi tayini yapılabilir. Hücrelerin bozulmasından kaçınmak için sonikasyonenerjisi ayarlanmalıdır.

Test kaplarını aşılamada kullanılan alg süspansiyonunun iyi karışmış ve homojen olmasını sağlamak için vorteks karıştırıcı veya benzer uygun bir yöntem kullanılır.

Test kapları, dairesel veya git-gel hareketi ile yaklaşık 150 devir/dakikada çalıştırılan çalkalayıcıya yerleştirilir. Alternatif olarak, *Anabaena*'nın yığınlaşma eğilimini azaltmak için kesikli çalkalama kullanılabilir. Eğer yığınlaşma olursa biyokütle ölçümleri için önlem olarak temsili numune alınmalıdır. Numune almadan önce alg kümelerini ayırmak için kuvvetli çalkalama gerekli olabilir.

Synechococcus leopoliensis.

Stok kültürü korumak için çeşitli büyüme ortamı kullanılabilir. Uygun ortam hakkında bilgi kültür koleksiyonlarında mevcuttur.

Synechococcus leopoliensis, tek ve ayrık çubuk şekilli hücreler olarak yetişir. Biyokütle ölçümleri için mikroskop sayımının kullanımını zorlaştıran hücreler oldukça küçüktür. Yaklaşık olarak 1 µm'ye kadar tane hesaplaması için donatılmış olan elektronik tane sayaçları kullanışlıdır. İn vitroflorimetrik ölçümler de uygulanabilir.

Navicula pelliculosa

Stok kültürü korumak için çeşitli büyüme ortamı, kullanılabilir. Uygun ortam hakkında bilgi kültür koleksiyonlarında mevcuttur. Ortam içerisinde silikatın gerek olduğu dikkate alınır.

Navicula pelliculosa, belirli büyüme koşulları altında kümelenme oluşturabilir. Lipid üretiminden dolayı alg hücreleri bazen yüzey katmanında birikme eğiliminde olurlar. Bu koşullar altında temsili numuneler elde etmek amacıyla biyokütle tayini için alt numuneler alındığında özel ölçümler yapılmalıdır. Örneğin vorteks karıştırıcı kullanarak kuvvetli çalkalama gerekli olabilir.

Büyüme ortamı

Aşağıdaki iki büyüme ortamından biri kullanılabilir:

OECD ortamı: OECD TG 201 orijinal ortamı, ISO 8692 uyarınca
ASTM uyarınca US. EPA ortamı AAP.

Bu ortamlar hazırlanırken, tepken ya da analitik saflıktaki kimyasallar kullanılmalı ve su deiyonize edilmelidir.

AAP-ortam (US. EPA) ve OECD TG 201 ortam bileşimi

Bileşen	US EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) EDTA demir molar oranıbirden çok az yüksek olabilir. Bu, demir çökelmesini korur ve aynı zamanda ağır metal iyonlarının şelatlanmasını en azaindirir.

Diatome*Naviculapelliculosa* ile test içerisinde 1,4 mg Si/l elde etmek için her iki ortam, $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ ile desteklenmelidir.

Ortam pH'ı, ortam karbonat sistemi ile atmosferik havada CO_2 kısmi basınç arasında denge durumunda iken elde edilir. 25 °C'de pH ve molar bikarbonat konsantrasyonu arasındaki ilişki:

$PH_{eq} = 11,30 + \log [HCO_3]$
15 mg $NaHCO_3$, pH_{eq}= 7,5 (U.S. EPA ortamı) ile ve 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (OECD ortamı) ile.

Test ortamının element bileşimi

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

OECD ortamı hazırlığı

Besin	Stok çözeltideki konsantrasyon
Stok çözelti 1: makrobesinler	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Stok çözelti 2: demir	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Stok çözelti 3: eser elementler	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Stok çözelti 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3.9H_2O$	

Stok çözeltiler, membranfiltrasyon (ortalama gözenek çapı 0,2 μm) ya da otoklav (120 °C, 15 dak.) ile sterilize edilir. Çözeltiler 4 °C'de karanlıkta saklanır.

Stok çözeltiler 2 ve 4 otoklava konulmaz, fakat membranfiltrasyonlasterilize edilir.

Suya uygun hacimde stok çözelti 1-4 eklenerek bir büyüme ortamı hazırlanır.

500 ml steril suya aşağıdakiler eklenir:
— 10 ml Stok çözelti 1
— 1 ml Stok çözelti 2
— 1 ml Stok çözelti 3
— 1 ml Stok çözelti 4

Karışım, steril su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Ortamın atmosferik CO_2 ile dengelenmesi için yeteri kadar beklenir, gerekirse filtrelenmiş steril hava ile birkaç saat kabarcıklanma yapılır.

AAP ortamının hazırlanması

A1.1. A1.2.1-A1.2.7 içindeki her stok çözeltinin 1 ml'si, yaklaşık 900 ml deiyonize edilmiş ya da damıtılmış suya eklenir ve daha sonra 1 L'ye seyreltilir.

A1.2. Makrobesin stok çözeltileri, aşağıdakilerin 500 ml deiyonize edilmiş ya da damıtılmış suda çözündürülmesi ile hazırlanır.
A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3, ve A1.2.4 reaktifleri bir stok çözeltisi içerisinde birleştirilebilir.

A1.2.1. $NaNO_3$—12,750 gr.
A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$—6,082 gr.
A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$—2,205 gr.
A1.2.4. *Mikrobesin stok çözeltisi*—(bkz A1.3).
A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—7,350 gr.
A1.2.6. K_2HPO_4—0,522 gr.
A1.2.7. $NaHCO_3$—7,500 gr.
A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$—Bakınız Not A1.1.
Not - A1.1 Sadece diatom test türleri için kullanılır. Doğrudan (202,4 mg) ya da ortam içinde 20 mg/L Si final konsantrasyonunu sağlamakiçin stok çözelti yoluyla eklenebilir.

A1.3. Mikrobesin stok çözelti, aşağıdaki bileşiklerin 500 ml deiyonize veya damıtılmış suda çözündürülmesi ile hazırlanır:
A1.3.1. H_3BO_3—92,760 mg.
A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$–207,690 mg.
A1.3.3. $ZnCl_2$—1,635 mg.
A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$—79,880 mg.
A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$—0,714 mg.
A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$—3,630 mg.
A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$—0,006 mg.
A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$—150,000 mg.
[Disodyum (Etilen dinitrilo) tetra asetat].
A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$—0,005 mg. Bakınız Not A1.2.
Not - A1.2 Sadece diatom türlerin stok kültürleri için ortam içerisinde kullanılır.
A1.4. pH, 0,1 *N* ya da 1,0 *N* NaOH veya HCl ile 7,5 ± 0,1'e ayarlanır.
A1.5. Tane sayacı kullanılacak ise 0,22-μm filtre; kullanılmayacak ise 0,45-μm filtre ile ortam, steril kap içine filtre edilir.
A1.6. Ortam, kullanılana kadar yaklaşık 4 °C'de karanlıkta saklanır.

Ek-III

Kültür algi için prosedür örneği

Genel gözlemler

Aşağıdaki prosedüre dayanan kültürün amacı toksisite testleri için alg kültürlerini sağlamaktır.

Alg kültürlerine bakteri bulaşmamasını garanti altına almak için uygun yöntemler kullanılmalıdır. Saf kültürler istenilir olabilir fakat tek alg kültürleri belirlenmeli ve kullanılmalıdır.

Bütün faaliyetler, bakteri ve diğer alg ile kirlenmeyiönlemek amacıyla steril koşullar altında gerçekleştirilmelidir.

Ekipman ve materyaller

Bakınız Test Yöntemi - Düzenekler.

Alg kültürleri elde etmek için prosedürler

Besin çözeltilerinin hazırlanması (ortam):

Ortamın bütün besin tuzları, konsantre edilmiş stok çözeltiler olarak hazırlanır ve karanlık ve soğuk bir ortamda saklanır. Bu çözeltiler, filtrasyon ve otoklav ile steril hale getirilebilir.

Bulaşma olmamasına dikkat ederek doğru stok çözelti miktarını, damıtılmış steril su içerisine ekleyerek ortam hazırlanır. Katı ortam için agarın %0,8'i eklenir.

Stok kültür:

Stok kültürler, başlangıç test materyali olarak kullanılmak üzere düzenli olarak taze ortama transfer edilen küçük alg kültürleridir. Eğer kültürler düzenli olarak kullanılmaz ise eğimli agar tüplerden dışa doğru çizgi oluştururlar. Bunlar, en az iki ayda bir taze ortama transfer edilir.

Stok kültürler, uygun ortam içeren (hacmi yaklaşık 100 ml) erlen içinde yetişirler. Alg, sürekli ışıklandırma ile 20 °C'de inkübe edildiğinde, haftalık transfer gerekir.

Transfer esnasında bir miktar 'yaşlı' kültür, steril pipet ile temiz ortam şişesine transfer edilir, bu sayede hızla büyüyen türlerdeki başlangıç konsantrasyon, yaşlı kültürdekinden yaklaşık 100 kat daha küçük olur.

Türlerin büyüme hızı, büyüme eğrisinden belirlenebilir. Eğer bu bilinir ise, hangi yoğunluktaki kültürün yeni ortama transfer edilebileceğini tahmin etmek mümkündür. Bu, kültür ölü faza ulaşmadan önce gerçekleştirilmelidir.

Ön-kültür:

Ön-kültür, test kültürlerinin aşılanması için uygun alg miktarını vermeyi amaçlar. Ön-kültür, test koşulları altında inkübe edilir ve normal olarak 2 ila 4 günlük inkübasyon süresinden sonra üssel büyüme sırasında kullanılır. Alg kültürleri şekil bozuklukları gösterdiğinde ve anormal hücreler içerdiğinde, atılmalıdır.

Doğrusal olmayan bağlanımlı veri analizi

Genel değerlendirmeler

Alg testlerindeki ve diğer mikrobiyal büyüme testlerindeki tepki; eğer büyüme hızı kullanılır ise proses hızıdır ve eğer biyokütle seçilir ise biyokütlenin zamana karşı integralidir. Biyokütle büyümesindeki tepki doğası gereği sürekli ya da metrik değişkendir. Alg testlerindeki birincil belirleme faktörü olarak ışık ve sıcaklık ile empoze edilmiş koşullar için maksimum tepki gösteren maruz kalmamış tekrar kontrollerinin ilgili ortalama tepkisi için her ikisine de başvurulur. Test sistemi dağıtılır ve homojen hale getirilir ve biyokütle, hücreleri ayrı değerlendirmeden bütün olarak gözden geçirilebilir. Bu sistem gibi tepki çeşidinin varyans dağılımı, ancak deneysel faktörler ile ilgilidir (genellikle hataların log-normal ya da normal dağılımıyla açıklanır). Bu, ayrı organizmaların toleransı (genellikle binominaldağılım uygulanmış) için olan var-yok verisi ile tipik biyodeney tepkilerin aksine çoğu kez baskın varyans bileşiği olacağı kabul edilir. Burada kontrol tepkileri sıfır seviyesi ya da arka plan seviyesidir.

Karışık olmayan durumlarda, normalleştirilmiş ya da bağıl tepkiler, r, monoton bir şekilde 1'den (sıfır yavaşlatma) 0'a (% 100 yavaşlatma) kadar azalır. Bütün tepkilerin birleşik olduğu ve görünen negatif yavaşlatma, sadece rastgele bir hatanın sonucu olarak hesaplanabildiği dikkate alınmalıdır.

Regresyon Analizi

Modeller

Regresyon analizi, Z = log C olan Y = f (C) ya da daha sıklıkla F (Z) matematiksel bağlanım fonksiyonu biçimindeki konsantrasyon – tepki eğrisini açıklamayı amaçlar. Ters fonksiyon olarak kullanılan $C = f^{-1}$ (Y), EC_{50}, EC_{10} ve EC_{20}'i içeren EC_x biçimleri ve %95 güven sınırlarının hesaplanmasına izin verir. Birçok basit matematiksel fonksiyonel biçimler, alg büyümesini yavaşlatma testlerinde elde edilen konsantrasyon-tepki ilişkilerini başarılı bir şekilde açıklar. Fonksiyonlar, örnek verecek olursak asimptotik olarak $C \rightarrow 0$ için bir ve $C \rightarrow \infty$ için sıfır yaklaşan bütün"s" biçimindeki eğriler (sigmoid) olan lojistik denklem, simetrik olmayan Weibul denklemi ve log normal dağıtım fonksiyonu içerirler.

Sürekli eşik fonksiyonu modellerinin kullanımı (örneğin "popülasyon büyümesini yavaşlatma" için Koyman modeli, Kooijman ve ark.1996), yakın zamanda önerilmiştir ya da asimptotik modellere alternatiftir. Bu model belirli bir eşiğin altındaki konsantrasyonlarda hiç etki olmadığını varsayar. Eşik konsantrasyon, yani EC0+, dışdeğerbiçim uygulayarak, başlangıç noktasında türevlenebilir olmayan basit sürekli fonksiyon vasıtasıyla konsantrasyon-tepki ilişkisinin konsantrasyon ekseni ile kesiştirilmesinden tahmin edilir.

Eğer heterojenlik telafi edilir ise analizin artık kareler toplamının basit minimizasyonu ya da ağırlıklı kareler olabilecekleri dikkate alınmalıdır.

Prosedür

Prosedür şu şekilde özetlenebilir: uygun fonksiyonel denklem Y = f (C) seçilir ve doğrusal olmayan bağlanım ile veriye yerleştirilir. Veriden mümkün olduğunca fazla bilgi çıkarmak amacıyla, tercihen tekrarların ortalama değeri yerine her ayrı şişeden ölçümler kullanılır. Diğer taraftan, eğer varyans büyük olur ise, tekrarların ortalama değerlerinin, tutulmuş her ayrı veri noktasına göre veri içerisindeki sistematik hatalardan daha az etkilenmiş ve daha sağlıklı matematiksel tahmin sağladığıpratikte tecrübe edilmiştir.

Uygun hale getirilmiş eğri ve ölçülmüş veri çizilir ve yerleştirilmiş eğrinin uygun olup olmadığı tetkik edilir. Kalıntıların analizi, bu amaç için kısmen yardımcı olabilir. Konsantrasyon tepkisini yerleştirmek için seçilen fonksiyonel ilişki, düşük konsantrasyonlardaki tepki gibi eğrinin önemli bir kısmını ya da tamamını tanımlamıyor ise diğer eğri yerleştirme seçeneği seçilir – örneğin simetrik olan yerine Weibul fonksiyon gibi simetrik olmayan eğri. Negatif yavaşlatmalar örneğin log normal dağılım fonksiyonunda problem olabilir ve benzer şekilde bir alternatif bağlanım fonksiyonu gerekebilir. Bu tür negatif değerlere sıfır ya da küçük pozitif bir değer vermek tavsiye edilmez çünkü bu, hata dağılımını bozar. Eğrinin düşük yavaşlama kısmı vb. farklı kısımlarında EC_{lowx} gibi değerleri tahmin etmek için ayrı eğriler çizmek daha uygun olabilir. Yerleştirilmişdenklemden ('ters tahmin' $C = f^{-1}(Y)$) karakteristik EC_x nokta tahminleri hesaplanır ve minimum olarak EC_{50} ve bir ya da iki $EC_{low\ x}$ tahmini rapor edilir. Test uygulamalarında veri noktalarının yeterli olduğu ve kirlilik etkeni olarak düşük konsantrasyonlarda uyarılma meydana gelmediği durumlarda, alg testinin doğruluğunun normalde %10 yavaşlama seviyesindegerçeğe yakın bir tahmin verdiği gözlenmiştir. EC_{20}kesinliği, genellikle EC_{10}'dan daha iyidir çünkü EC_{20}çoğunlukla, merkezi konsantrasyon tepki eğrisinin doğrusalkısmında yerleşmektedir. Büyümenin uyarılmasından dolayı bazen EC_{10}'u yorumlamak zor olabilir. Bu nedenle EC_{10}, yeterli doğruluk ile elde edilebilir olmasına rağmen, her zaman EC_{20}'nin de raporlanması tavsiye edilir.

Ağırlıklama faktörleri

Deneysel varyans genel olarak sabit değildir ve tipik olarak orantılı bir bileşen içerir. Bu nedenle rutin olarak ağırlıklı bağlanım yürütmek avantajlıdır. Bu tür bir analiz için ağırlıklama faktörlerinin, varyansa ters orantılı olduğu kabul edilir.

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Birçok bağlanım programı, tabloda listelenmiş olan ağırlıklama faktörleri ile ağırlıklı bağlanım analizine izin verir. Ağırlıklama faktörleri, $n/\Sigma\ w_i$ (n, veri noktalarının sayısı) ile çarpılarak uygun bir şekilde normalleştirilir, bu sayede toplamları 1'e eşit olur.

Normalleştirme tepkileri

Ortalama kontrol tepkisiyle normalleştirme bazı temel problemlere yol açar ve oldukça karmaşık varyans yapısına sebep olur. Yavaşlama yüzdesini elde etmek için tepkileri, ortalama kontrol tepkisine bölmek, kontrol ortalaması üzerindeki hatadan kaynaklanan ek bir hataya sebep olur. Eğer bu hata göz ardı edilecek kadar küçük değilse, bağlanım ve güven sınırlarındaki ağırlıklama faktörleri kontrol ile ortak değişiklik için doğrulanmalıdır (17). Ortalama kontrol tepkisitahmininin yüksek doğruluk ve hassasiyette olması, bağıl tepki için toplam varyansı minimize etmede önemlidir. Bu varyans aşağıdaki gibidir:

(alt simge i, konsantrasyon seviyesi i'yi; alt simge 0, kontrolleri belirtir)

Y_i=bağıl tepki $=r_i/r_0=1-f(C_i)$

varyans ile:

$Var(Y_i)=Var(r_i/r_0)\cong(\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot Var(r_i)+(\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

bu nedenle:

$(\partial Y_i/\partial r_i)=1/r_0$ ve $(\partial Y_i/\partial r_0)=r_i/r_0^2$

normal olarak dağıtılmış veri ile ve m_i ve m_0 tepkileri ile:

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

bağıl tepkinin toplam varyansı, Y_i şöyle olur:

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

Kontrol ortalamasındaki hata, ortalaması alınmış kontrol tepkilerinin kareköküne ters orantılıdır ve geçmiş verileri içermesi için ve hatayı büyük ölçüde azaltma yoluyla gerekçelenebilir. Diğer bir seçenek, veriyi normalleştirmeden tepkileri oldukları gibi tam yerleştirmek ve kontrol tepki verisini de dahil etmek fakat bu veriyi, yani kontrol tepki verisini, doğrusal olmayan bağlanımla yerleşecek ek bir parametre olarak kullanmaktır. Olağan 2 parametreli bağlanım denkleminde bu yöntem 3 parametre yerleştirilmesini gerekli kılar ve bu nedenle önceden ayarlı kontrol tepkisi kullanarak normalleştirilmiş verideki doğrusal olmayan regresyondan daha çok veri noktasına gereksinim duyar.

Ters güven aralıkları

Ters hesaplamayla çizgisel olmayan bağlanım güven aralıklarının hesaplanması oldukça karmaşıktır ve olağan istatistiksel bilgisayar programı paketlerinde uygun bir standart seçenek değildir. Yaklaşık güven sınırları; örneğin tahmin edilecek parametreler olarak EC_{10} ve EC_{50} gibi istenen nokta tahminleri ile matematiksel denklemin tekrar yazılmasını kapsayan tekrar parametreoluşturarak (Bruce ve Versteg) standart doğrusal olmayan bağlanım programları ile elde edilebilir (fonksiyonun I = f (α, β, konsantrasyon) olmasına izin verilir ve f (α, β, konsantrasyon) ile eşdeğer fonksiyon g (EC_{10}, EC_{50}, konsantrasyon) yer değiştirmek için f (α, β, EC_{10}) = 0,1 ve f (α, β, EC_{50}) = 0,5 ilişkisinin tanımı kullanılır).

Daha doğru bir hesaplama (Andersen ve ark., 1998), orijinal denklemi koruyarak ve r_i ve r_0 ortalamaları çevresindeki Taylor genişlemesini kullanarak uygulanır.

Yakın zamanda 'öz yükleme yöntemleri' yaygın olmuştur. Bu gibi yöntemler ölçülmüş veri kullanır ve denemeli varyans dağılımını tahmin etmek amacıyla yaygın yeniden numune almaya yönelik bir rasgele sayı üretici kullanır.

Kaynakça

- Kooijman, S.A.L.M.;Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effectconcentrations in algalgrowthinhibitiontests. WaterResearch, 30, 1625-1632.
-Bruce, R.D. andVersteeg, D.J.(1992) A Statistical ProcedureforModellingContinuousEcotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494.
- Andersen, J.S.,Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. &Nyholm, N. (1998): Continuousecotoxicological data evaluatedrelativeto a controlresponse. Journal of Agricultural, BiologicalandEnvironmentalStatistics, 3, 405-420.

C.4. "KOLAY" BİYOLOJİK BOZUNABİLİRLİK TESPİTİ

BÖLÜM I. GENEL DEĞERLENDİRMELER

I.1 Giriş

Bir aerobik (havalandırılmış ortam) sulu ortamda kolay biyolojik bozunabilme için kimyasalların gözlenmesine izin veren altı yöntem tanımlanmıştır:
(a) Çözünmüş Organik Karbon (DOC) (Güç kaybı-Kaybolum) (C.4-A yöntemi)
(b) Değiştirilmiş OECD Gözlemi – DOC (Güç kaybı-Kaybolum) (C.4-B yöntemi)
(c) Karbon dioksit (CO_2) Dönüşümü (Değiştirilmiş Sturm Testi) (C.4-C yöntemi)
(d) Manometrik (basıç ölçümlü) Respirometre (solunum ölçer) (C.4-D yöntemi)
(e) Kapalı şişe (C.4-E metodu)
(f) MITI (Uluslar Arası Ticaret ve Endüstri Bakanlığı- Japonya) (C.4-F yöntemi)
Tüm altı test için genel ve ortak değerlendirmeler yöntemin I. Bölümünde verilmiştir. Ayrı metotlar için belirli (özgül) ayrıntılar II ve VII. bölümler arasında açıklanmıştır. Ekler, tanımları, formülleri ve kılavuz maddelerini kapsamaktadır.
1998 yılında gerçekleştirilen bir OECD laboratuvarlar arası karşılaştırma uygulaması metotların tutarlı sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bununla birlikte, teste tabi tutulacak olan malzemenin fiziksel özelliklerine bağlı olarak, metotlardan bir ya da diğeri tercih edilebilir.

I.2 Uygun yöntemin seçilmesi

En uygun yöntemin seçilmesi için kimyasalların çözünürlüğü, buhar basıncı ve adsorpsiyon özellikleri hakkında bilgi sahibi olmak zorunludur. Kimyasal yapı ya da formül, kuramsal değerlerin ve/veya değişkenlerin ölçüm yapılmış değerlerinin kontrol edilmesi için bilinmek zorundadır, örneğin ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD gibi (bakınız Ek-I ve II.)

En az 100 mg/l miktarında su içerisinde çözünebilen test kimyasalları uçucu ve adsorblayıcı olmamaları koşuluyla tüm metotlar kullanılarak değerlendirilebilir. Suda az çözünen, uçucu ya da adsorblayıcı kimyasallar için uygun metotlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Suda az çözünen kimyasallar ve uçucu kimyasalların işleme tabi tutulma şekilleri Ek-III'de tarif edilmiştir. (Uygun şekilde tıpalanmak zorunda olan) test kabında gaz için yeteri kadar boşluk bulunduğu takdirde, orta derecede uçucu kimyasallar DOC Die-Away metoduyla test edilebilirler. Bu durumda herhangi bir fiziksel zararı hesaba katmak için bir abiyotik kontrol gerçekleştirilmelidir.

Tablo I: Test metotlarının uygulanabilirliği

Test	Analitik Yöntem	Şu özelliklerdeki maddelere uygunluk:		
		Az çözünür	Uçucu	Adsorblayıcı
DOC Die-Away (Kaybolum)	Çözünmüş organik karbon	-	-	+/-
Mod. OECD Die-Away (Kaybolum)	Çözünmüş organik karbon	-	-	+/-
CO_2Dönüşümü	Respirometre: CO_2Dönüşümü	+	-	+
Manometrik Respirometre	Manometrik Respirometre: oksijen tüketimi	+	+/-	+
Kapalı Şişe	Respirometre: Çözünmüş oksijen	+/-	+	+
MITI	Respirometre: oksijen tüketimi	+	+/-	+

Test maddesinin başlıca bileşiklerinin nispi oranları ya da saflığı hakkında bilgi, özellikle sonuçlar düşük veya çok az olduğu zaman, elde edilen sonuçların yorumlanması için gereklidir.

Test kimyasal maddesinin bakteri için toksisitesi(zehirliliği) hakkındaki bilgi (EK- IV) uygun test derişimlerinin seçimi için faydalı ve düşük biyolojik bozunma değerlerinin doğru olarak yorumlanması için gerekli olabilir.

I.3 Referans maddeler

İşlemleri kontrol etmek amacıyla, kolay biyolojik bozunma ölçütlerini karşılayan referans kimyasal maddeleri normal test yollarına paralel olarak uygun bir kaba konularak test edilir.

Uygun kimyasallar anilin (yeni damıtılmış), sodyum asetat ve sodyum benzoattır. Bu referans kimyasallarının tümü hiçbir aşı (inaculum) kasıtlı olarak ilave edilmese bile bu metotlarda ayrışırlar.

Kolay biyolojik bozunur olan fakat bir aşının ilave edilmesi gereken bir referans kimyasal maddesinin araştırılması gerektiği öne sürülmüştür. Potasyum hidrojen ftalat ortaya atılmıştır fakat bu maddenin bir referans maddesi olarak kabul edilebilmesinden önce bu maddeyle ilgili daha fazla kanıt elde edilmesi gerekmektedir.

Respirometrik testlere, azot içeren bileşikler nitratlaşma nedeniyle oksijen alınımını etkileyebilir (bakınızEk-II ve V).

I.4 Test yönteminin ilkesi

Bir mineral ortamındaki test maddesinin çözeltisi, ya da süspansiyonu, karanlık ya da dağınık ışıkta aerobik (havalandırılmış) koşullar altında aşılanır ve geliştirilir. Aşı için gereken test çözeltisindeki DOC miktarı test maddesi için gereken DOC miktarıyla karşılaştırılarak mümkün olan en düşük seviyede tutulmalıdır. Madde içinde var olan hücrelerin içsel aktiviteleri, içsel kontrolüne tam olarak uymayacak olmasına rağmen, aşının içsel faaliyetleri için tolerans testleri ve test maddesi olmadan aşıyla kör testleri aynı doğrultuda işleme tabi tutularak yapılır. Bir referans maddesi, yöntemlerin işleyişini kontrol etmek için aynı doğrultuda test edilir.

Genellikle, bozunmayı DOC, CO_2 üretimi ve oksijen alımı gibi değişkenlerin belirlenmesi takip eder ve bozunmanın başlangıcı ve bitiminin tespit edilmesine imkan vermek için yeteri derecede sıklıkla tekrarlanan aralıklarla ölçümler yapılır. Otomatik respirometrelerle ölçümler sürekli hale gelir. DOC kimi zaman başka değişkenlerle ölçülür fakat bu genellikle yalnızca testin başlangıcı ve bitiminde gerçekleştirilir. Özgün kimyasal analizleri aynı zamanda test maddesinin ilk bozunmanın değerlendirilmesi ve oluşan ara maddelerin konsantrasyonunun saptanması (MITI testinde zorunludur) için kullanılabilir.

Normal olarak test 28 gün sürer. Bununla birlikte testler 28 günden önce de sona erebilir, örneğin biyolojik bozunabilirlik eğrisi en az 3 tespit için bir platoya ulaşır ulaşmaz. Testler aynı zamanda, eğrinin biyolojik bozunabilirliğin başladığını fakat platonun 28 güne ulaşmamış olduğunu gösterdiği zaman, 28 günden uzun sürebilir.

I.5 Kalite kriterleri

I.5.1 Yeniden yapılabilirlilik

Biyolojik bozunabilirliğin doğası ve aşı olarak kullanılan karışık bakteriyel populasyonlar nedeniyle, saptamalar en az iki kez gerçekleştirilmelidir.

Test ortamına başlangıçta eklenen mikro-organizmaların konstantrasyonu ne kadar çok olursa, tekrarlar arasındaki farkların o kadar az olacağı ortak bir kanıdır. Halka testleri aynı zamanda farklı laboratuarlardan elde edilen sonuçlar arasında büyük farklılıklar olabileceğini ortaya koymuştur, fakat kolay biyolojik bozunabilir bileşiklerle normal olarak iyi uygunluk elde edilmiştir.

I.5.2 Testin geçerliliği

Testin bitiminde ya da 10 günlük zaman dilimi sonunda, uygun olduğu şekilde, platodaki test kimyasalının uzaklaştırılmasının tekrarlanan değerlerinin sınır değer farkları %20'den az olduğu ve referans maddesinin bozunma yüzdesi 14 gün içerisinde kolay biyolojik bozunabilirlik seviyesine ulaştığı takdirde bir test geçerli olarak değerlendirilir. Eğer bu koşulların her ikisi de sağlanmazsa, test tekrarlanmalıdır. Metotların zorluğu nedeniyle, düşük değerler muhakkak test maddesinin çevresel koşullar altında biyolojik bozunabilir olmadığı anlamına gelmez fakat biyolojik bozunabilirliğin tespit edilmesi için daha fazla çalışmanın gerekli olduğunu gösterir.

Hem test maddesini hem de referans kimyasalını içeren bir toksisite (zehirlilik) testinde, 14 gün içerisinde %35'den az (DOC'ye bağlı olarak) ya da %25'ten az (ThOD ya da $ThCO_2$'ye

bağlı olarak) bozunma meydana gelirse, test kimyasalları engelleyici olarak kabul edilebilir (bakınız EK- IV). Eğer mümkünse daha düşük bir test kimyasalı konsantrasyonu ve/veya 30 mg katı/litre miktarından fazla olmamak koşuluyla daha yüksek bir aşı konsantrasyonu kullanılarak test dizileri tekrarlanmalıdır.

I.6 Genel işlemler ve hazırlıklar

Testlere uygulanan genel koşullar Tablo 2'de özetlenmiştir. Özellikle ayrı bir teste ilişkin düzenekler ve diğer deneysel koşullar daha sonra bu test için bir başlık altında açıklanmıştır.

Tablo 2: Test Koşulları

Test	DOC Die-Away (Kaybolum)	CO_2 Dönüşümü	Manometrik Respirometre	Değiştirilmiş OECD Gözlemi	Kapalı Şişe	MITI (I)
mg/l mg DOC/l mg ThOD/l olarak test maddesi konsantrasyonları	10-40	10-20	100 50-100	10-40	2-10 5-10	100
Aşı konsantrasyonu (hücre/l bazında, yaklaşık olarak)	30 mg/l SS ya da 100 ml akışkan atık/l (10^7- 10^8)			0,5 ml ikincil akışkan atık/l (10^5)	5 ml akışkan atık/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Mineral ortamındaki bileşiklerin konsantrasyonu (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					Tercihen 7,0
Sıcaklık	22± 2 °C					25± 1 °C
DOC: Çözünmüş organik karbon katılar			ThOD: Teorik Oksijen Talebi			SS: Askıda

I.6.1 Seyreltme suyu

Zehirli maddelerin Cu^{++} iyonları gibi engelleyici konsantrasyonlarını içermeyen iyonu giderilmiş su kullanılır. Test maddesi tarafından ortaya konulan organik karbon içeriğinin %10'undan fazlasını içermemelidir. Yüksek kör değerlerin yok edilmesi için test suyunun yüksek oranda saf olması gereklidir. Doğal safsızlıklar ve aynı zamanda iyon değişimi reçineleri ve hücreleri lisinle eritilmiş maddelerden ve bakteri ve su yosunlarından kirlilik meydana gelebilir. Her bir test serisi için yalnızca DOC analizi tarafından önceden kontrol

edilmiş bir su partisi (miktarı) kullanın. Bu gibi bir kontrol kapalı şişe testi için gerekli değildir, fakat oksijen tüketimi düşük seviyede olmalıdır.

I.6.2 Mineral bileşenlerinin stok çözeltileri

Test çözeltileri hazırlamak için mineral bileşiklerin uygun konsantrasyonlarının stok çözeltileri hazırlanır. Sonraki stok çözeltileri (farklı seyreltme faktörleriyle birlikte) DOC, Değiştirilmiş OECD Gözlemi, CO_2 Dönüşümü, Manometrik Respirometre, Kapalı Şişe testi metotları için kullanılabilir.

Seyreltme faktörleri ve MITI testi için mineral ortamının özel hazırlanması özel testler başlığı altında açıklanmıştır.

Stok çözeltileri:

Analitik saflıkta reaktifler kullanarak, aşağıdaki stok çözeltileri hazırlanır.

(a) Monopotasyum dihidrojen ortofosfat, KH_2PO_4 8,50 g
Dipotasyum monohidrojen ortopfosfat, K_2HPO_4 21,75 g
Disodyum monohidrojen ortofosfat dihidrat, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 33,40 g
Amonyum Klorür, NH_4Cl 0,50 g
Suda çözerek 1 litreye tamamlanır. Çözeltinin pH değeri 7,4 olmalıdır.

(b) Kalsiyum Klorür, susuz, $CaCl_2$ 27,50 g
veya Kalsiyum Klorür dihidrat, $CaCl_2.2H_2O$ 36,40 g
Suda çözerek 1 litreye tamamlanır.

(c) Magnezyum sülfat heptahidrat, $MgSO_4.7H_2O$ 22,50 g
Suda çözünüz ve 1 litreye tamamlayınız.

(d) Demir (III) Klorür hekzahidrat, $FeCl_3.6H_2O$ 0,25 g
Suda çözünüz ve 1 litreye tamamlayınız.

Not: Bu çözeltiyi kullanımdan hemen önce hazırlamak zorunluluğundan kurtulmak için, bir litre çözeltiye bir damla derişik HCl ya da her litre için 0,4 g etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA) eklenir.

I.6.3 Kimyasalların stok çözeltileri

Örneğin test ya da referans kimyasalının 1-10 gramını uygun olduğu biçimde iyonu giderilmiş suda çözünüz ve çözünürlük 1g/l'yi geçince 1 litreye tamamlayınız. Başka biçimde, mineral ortamında stok çözeltileri hazırlayınız ya da kimyasal maddeyi doğrudan mineral ortama ilave ediniz. Daha az çözünür kimyasalların işleme tabi tutulması için Ek-III'e bakınız, fakat MITI testinde (Metot C.4-F) ne çözücüler ne de emülsiyon yapıcı maddeler kullanılmamalıdır.

I.6.4 Aşı (Inocula)

Aşı değişik kaynaklardan elde edilebilir: aktif çamur, kanalizasyon atık suları (sewage effluent) (klorlanmamış), yüzey suları ve toprak ya da bunların karışımı. DOC Die-Away ,CO_2 Dönüşümü ve Manometrik Respirometre testleri için, aktif çamur kullanıldığı takdirde,

çoğunlukla evsel atık suların arıtıldığı laboratuvar ölçekli arıtma biriminden ya da atık su arıtma tesisinden alınmalıdır. Diğer kaynaklardan elde edilen aşıların daha yüksek oranda yaygın sonuçlar verdiği ortaya çıkarılmıştır. Değiştirilerek iyileştirilmiş OECD Gözlemi veKapalı Şişe testleri için sulu çamur fiyokları ihtiva etmeyen daha çok seyreltilmiş bir aşıya ihtiyaç duyulmaktadır ve tercih edilen kaynak evsel atıksu arıtma tesisi ya da laboratuvar ölçekli evsel atık suların arıtıldığı arıtma biriminden elde edilen ikincil bir akışkan atıktır. MITI testi için aşı bir karışım kaynağından elde edilir ve bu özel teste ait başlık altında açıklanmıştır.

I.6.4.1 Aktif çamurdan elde edilen aşı

Ağırlıklı olarak evsel atıksuyu arıtan bir atıksu arıtma tesisinin havalandırma tankından ya da laboratuvar ölçekli bir arıtma biriminden aktif çamur örneği alın. Gerekli olduğu takdirde sık delikli bir elek aracılığıyla büyük parçaları ayırın ve bundan sonra atıksuyu açık havada bırakınız.

Alternatif olarak, büyük parçaların ayıklanmasından sonra aktif çamuru çökeltin veya (örneğin 1100xg'de 10 dakika boyunca) santrifüj edin. Çamur çöktükten sonra üstte kalan suyu yüzen parçalarla beraber dökün. Çamur mineral ortamda yıkanabilir. 3-5 g askıda katı/l'lik bir konsantrasyon elde etmek için derişik çamuru mineral ortam içinde süspanse edin ve gerektiği ana kadar havalandırın.

Aktif Çamur örneği, düzgün bir şekilde çalışan geleneksel bir tesisten alınmalıdır. Eğer, yüksek hızlı arıtma yapan bir tesisdten alınmak zorundaysa ya da engelleyici (inhibitör) ihtiva ettiği düşünülüyorsa, çamur yıkanmalıdır. Tam olarak gerçekleştirilen bir karıştırmadan sonra yeniden askıda duran çamuru çökeltin ya da santrifüj kullanın, çöktürmeden sonra üstte kalan suyu ve yüzen parçaları atın ve yıkanmış çamurun üstüne yeniden mineral ortam ekleyerek karıştırın (çamuru süspanse edin). Çamurun besinden (substrat) veya engelleyiciden arındığına kanaat getirinceye kadar bu işlemi tekrarlayın.

Tüm katı yeniden askıda kalacak şekilde tam karıştırılan ya da işlem görmemiş aktif çamur'dan, kullanmadan hemen önce askıda katı maddelerin kuru ağırlıklarının saptanması için bir örnek alın.

Başka bir seçenek aktif çamuru homojen hale getirmektir (3-5 g askıda katı/l). Çamuru orta hızda, 2 dakika boyunca mekanik karıştırıcıda işleme tabi tutun. Harmanlanmış çamuru 30 dakika boyunca veya gerekiyorsa daha uzun süre çökelmeye bırakın ve sıvıyı aşı olarak, mineral ortamın litresi başına 10 ml oranında kullanmak üzere ayırın.

I.6.4.2 Diğer aşı kaynakları

Ağırlıklı olarak evsel atık su alan laboratuvar ölçekli bir atıksu arıtma birimi ya da bir atıksu arıtma tesisinin ikincil arıtım çıkış suyundan elde edilebilir. Taze bir örnek alınız ve taşırken havadar bir ortamda tutunuz. İçindeki katı maddelerin çökelmesi için bir saat bekleyiniz veya kalın süzgeç kağıdı aracılığıyla süzünüz ve süzüntüyü veya çökelmeden sonra üstte kalan sıvıyı ayırarak gerekli olduğu zamana kadar aerobik ortamda saklayınız. Bu tür bir aşının 100 ml miktarına kadarı bir litre ortam için kullanılabilir.

Aşı için bir diğer kaynak yüzey suyudur. Bu durumda, nehir, göl gibi uygun bir yüzey suyundan örnek alınız ve gerektiği kadar havalandırılır. Gerekli olduğu takdirde, süzme ya da santrifüj yaparak aşı yoğunlaştırılmalıdır.

I.6.5 Aşının ön koşullandırması

Aşı deneysel koşullar için önceden hazırlanabilir fakat test kimyasalına önceden uyarlanmamalıdır. Ön koşullandırma aktif çamurun mineral ortamda veya ikincil akışkan atığın 5-7 gün boyunca test sıcaklığında havalandırılmasını kapsar. Kimi zaman ön koşullandırma kör değerlerinin indirgenmesiyle test metotlarının kesinliğini düzenler. MITI aşısının önceden hazırlaması gereksiz olarak değerlendirilmektedir.

I.6.6 Abiyotik (canlı bulunmayan ortamda) kontroller

Gerekli olduğu zaman, DOC'nin uzaklaştırılması, oksijen alınımı veya aşı içermeyen steril kontrollerde karbon dioksit dönüşümü belirlenerek test maddesinin olası abiyotik bozunmasını kontrol edin. Bir membran (0,2-0,45 mikrometre) vasıtasıyla süzme ya da uygun bir konsantrasyona uygun toksik (zehirli) maddenin eklenmesiyle sterilize edin. Membranla süzme işlemi kullanıldığı takdirde, sterillik sağlanması için mikro organizma içermeyen örnekler alın. Test kimyasallarının adsorpsiyonu önceden değerlendirilirse, özellikle aktif çamur aşısıyla birlikte, DOC'nin uzaklaştırılması gibi biyolojik bozunabilirliği ölçen testler aşılanan ve zehirlenen bir abiyotik kontrolü kapsamalıdır.

I.6.7 Cam balon sayıları

Tipik bir işlemde cam balon sayıları her bir başlık altında açıklanmıştır.
Aşağıdaki cam balon tipleri kullanılabilir:
Test süspansiyonu: test maddesi ve aşıyı ihtiva eden
Kör aşı: yalnızca aşıyı ihtiva eden
işlem kontrolu: referans maddesi ve aşıyı ihtiva eden
Adsorpsiyon kontrolu: test maddesi, aşı ve sterilize edici etkin madde
Toksisite (zehirlilik) kontrolu: test maddesi, referans maddesi ve aşıyı ihtiva eden

Test maddesi ve kör aşının belirlenmesinin paralel yapılması zorunludur. Aynı zamanda diğer cam balonlardaki belirlemelerin de paralel yapılması da önerilmektedir.

Bununla birlikte bu her zaman mümkün olmayabilir. Yeterli örnek ve ölçümün, 10 günlük zaman dilimi içerisindeki uzaklaştırılma yüzdesinin değerlendirilmesine imkan verilecek şekilde, alınmasını sağlayın.

I.7 Veriler ve değerlendirme

Bozunma oranı D_t'nin hesaplanmasında, hem test kaplarında hem de kör aşı değişkenlerinde yapılan tekrarlanan ölçümlerin ortalama değerleri kullanılır. Özel testler hakkındaki formüller aşağıdaki bölümlerde açıklanmıştır. Bozunma işlem sırası grafiksel olarak gösterilmiş ve 10 gün zaman dilimi işaret edilmiştir. Uygun olan hangisi ise, 10 günlük zaman diliminin bitiminde ya da testin sonunda elde edilen uzaklaştırma yüzdesi ve platodaki değeri hesaplayın ve kontrol edin.

Nefes alıp-verme testlerinde azot içeren bileşikler nitratlaşma nedeniyle oksijen alınımını etkileyebilir (Bakınız Ek-II ve V).

I.7.1 DOC belirlemeyle ölçülen bozunma

Her örnek alındığında, alınan bozunma oranı D_t, testlerin geçerliliğinin değerlendirilebilmesini sağlamak amacıyla tekrarlanan DOC ölçümlerinin ortalama değerleri kullanılarak test maddesi ihtiva eden cam balonlar için ayrı olarak hesaplanmalıdır. (Bakınız 1.5.2) Aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplama yapılır:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

D_t = t zamanında bozunma yüzdesi
C_o = Test maddesini ihtiva eden aşılanmış kültür ortamında DOC ortalama başlangıç konsantrasyonu (mg DOC/l)
C_t = t zamanında test maddesini ihtiva eden aşılanmış kültür ortamında DOC konsantrasyonu (mg DOC/l)
C_{b0} = kör aşılanmış mineral ortamındaki ortalama DOC konsantrasyonu (mg DOC/l)
C_{bt} = t zamanında açık aşılanmış mineral ortamında DOC konsantrasyonu (mg DOC/l) anlamına gelmektedir.

Tüm konsantrasyonlar deneysel olarak ölçülmelidir.

I.7.2 Özel analiz vasıtasıyla ölçülen bozunmalar

Belirli analitik veri elde edilebilir olduğu zaman,

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

denklemini kullanarak başlangıç bozunmasını hesaplayın.

Burada:

D_t = Normal olarak 28 gün olan, t zamanında bozunma yüzdesi
S_a = Testin sonunda aşılanmış ortamdaki test maddesinin artık miktarı (mg)
S_b = Yalnızca test maddesinin ilave edildiği su/ortamlı kör testindeki test maddesinin artık miktarı (mg) anlamına gelmektedir.

I.7.3. Abiyotik bozunma

Abiyotik steril kontrolu kullanıldığı zaman,

$$\%\ abiyotik\ bozunma = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

denklemini kullanarak abiyotik bozunma oranını hesaplayınız.

Burada:
$C_{s(0)}$ = 0. günde steril kontrolunde DOC konsantrasyonu
$C_{s(t)}$ = t. Günde steril kontrolunde DOC konsantrasyonu anlamına gelmektedir.

I.8 Raporlama

Mümkün olduğu yerlerde test raporu aşağıdakileri kapsamalıdır:
- Test ve referans maddeleri ve bunların saflıkları;
- Test koşulları;
- Aşı: niteliği ve örnek alma yeri/yerleri, konsantrasyon ve herhangi bir ön koşullandırma işlemi;
- Eğer biliniyorsa, atık sudaki mevcut endüstriyel atığın niteliği ve oranı;
- Test süresi ve sıcaklık;
- Az çözünür test kimyasallarının olduğu durumda, yapılan işlem;
- Uygulanan test metodu; herhangi bir işlem değişikliği söz konusu ise bu değişikliklerin bilimsel nedenleri ve açıklaması;
- Veri formu;
- Herhangi bir yavaşlatım (inhibisyon) olayı;
- Gözlemlenen herhangi bir abiyotik bozunma;
- Elde edilebilir olduğu takdirde, özel kimyasal analitik veri;
- Elde edilebilir olduğu takdirde, aracılar hakkında analitik veri;
- Test ve referans maddeleri için zamana karşı bozunma oran grafiği; son evre, bozunma evresi, 10 günlük zaman dilimi ve eğim açık olarak gösterilmelidir (EK- I). Test geçerlilik ölçütüne uygunsa, test maddesini ihtiva eden cam balonların bozunma yüzdelerinin ortalamaları grafik için kullanılabilir.
- 10 günlük zaman diliminden sonraki ve platodaki veya test sonundaki uzaklaştırma yüzdesi.

BÖLÜM II. DOC DIE-AWAY (Kaybolum) TESTİ (Yöntem C.4-A)

II.1 Test yönteminin ilkesi

Esas nominal organik karbon kaynağı olarak bilinen bir test maddesi konsantrasyonu (10-40 mg DOC/L)içeren aşılanmış mineral ortamın ölçülen miktarı (hacmi) 22±2 °C'de karanlık ya da dağılmış ışıkta havalandırılır.

Bozunmayı, 28 günlük süre boyunca sıklıkla tekrarlanan aralıklardaki DOC analizi takip eder. Biyolojik bozunabilirlik derecesi başlangıçta mevcut olan konsantrasyon yüzdesi olarak uzaklaştırılan DOC konsantrasyonu (kör aşı kontrolü için düzeltilen) ifade edilerek hesaplanır. Başlangıç biyolojik bozunabilirlik derecesi aynı zamanda inkübasyon (kuluçka) başlangıç ve bitişinde yapılan ek kimyasal analizlerinden hesaplanabilir.

II.2 Test yönteminin tanımlanması

II.2.1 Cihazlar

(a) konik cam balonlar, örneğin DOC analizi için gerekli olan hacme bağlı olarak 250 ml'den 2 l'ye kadar;

(b) ya otomatik ısı kontroluyla birlikte ya da sabit oda sıcaklığında kullanılan konik cam balonları yerleştirmek için ve tüm cam balonlarda havalandırma şartlarını sağlamak için yeterli güçte çalkalama makineleri;
(c) uygun membranlı süzme düzenekleri;
(d) DOC analiz cihazı;
(e) çözünmüş oksijeni belirlemek için düzenek;
(f) santrifüj.

II.2.2 Mineral ortamının hazırlanması

Stokt çözeltilerinin hazırlanması için I.6.2 bölümüne bakınız.
800 ml seyreltme suyuyla 10 ml çözeltiyi (a) karıştırın, 1 ml (b) ve (d) çözeltisi ekleyin ve seyreltme suyuyla birlikte 1 litreye ayarlayın.
II.2.3 Aşının hazırlanması ve ön şartlandırılması

Aşı farklı kaynaklardan elde edilebilir: aktif çamur; akışkan atıksu; yüzey suları; toprak veya bunların bir karışımı.
I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ve I.6.5 bölümlere bakınız.

II.2.4 Cam balonların hazırlanması

Örnek olarak, 2 L'lik konik cam balonlara 800 ml mineral ortamdan koyun ve 10-40 mg DOC/l'ye eşit kimyasal konsantrasyonu sağlamak için farklı cam balonlara test ve referans maddelerinin stok çözeltilerinden gerekli miktarda ekleyin. pH değerlerini kontrol edin ve gerekli olduğu takdirde 7,4'e ayarlayın. 30 mg askıda katı/l'den fazla olmayan son konsantrasyonu elde etmek için aktif çamur ya da diğer aşı kaynaklarıyla (I.6.4 bölüme bakınız) cam balonları aşılayın. Aynı zamanda test veya referans kimyasalları olmadan mineral ortamda aşı kontrolleri hazırlayın.

Gerekli olduğu takdirde, mineral ortamda, hem test hem de referans kimyasalları bakımından karşılaştırılabilir konsantrasyonlar ihtiva eden bir çözelti aşılama yoluyla test kimyasallarının olası yavaşlatıcı (inhibe edici) etkisini kontrol etmek için bir kap kullanın.
Aynı zamanda gerekli olduğu takdirde, bu test aşılanmamış çözeltisini kullanılarak abiyotik olarak bozunmaya uğrayıp uğramadığını kontrol etmek için başka steril cam balon kullanın.(I.6.6 bölüme bakınız)

Buna ilaveten test kimyasalının cam ve atık su gibimalzemeler tarafından kayda değer oranda adsorplandığından şüphe ediliyorsa, olası adsorpsiyon var olup olmadığını ve böylelikle kimyasal madde için testin uygunluğunu belirlemek için bir ön değerlendirme yapın (Tablo 1'e bakınız). Test maddesi, aşı ve sterilize edici madde ihtiva eden bir cam balon hazırlayın.

Tüm cam balonlardaki hacimleri (miktarları) mineral ortamla birlikte 1 L yapınız ve karıştırdıktan sonra DOC'nin ilk konsantrasyonunu saptamak için her bir cam balondan örnekler alınız (Ek-II.4'e bakınız.) Cam balonların ağızlarını örneğin alüminyum folye ile cam balon ve çevreleyen atmosfer arasında serbest hava geçişine izin verecek şekilde kapatınız. Daha sonra testi başlatmak için kapları çalkalama düzeneğine yerleştiriniz.

II.2.5. Tipik çalışmada cam balon numaraları

Kap 1 ve 2: test süspansiyonu

Kap 3 ve 4 cam balon: kör aşı
Kap 5: işlem kontrolu
Tercihen ve gerekli olduğu yerlerde:
Kap 6: abiyotik steril kontrolu
Kap 7: adsorpsiyon kontrolu
Kap 8: toksisite (zehirlilik) kontrolu
Aynı zamanda I.6.7 bölüme bakınız.

II.2.6 Testin performansı

Test boyunca, bilinen zaman aralıklarında tekrarlayarak, yeterince sıklıkla 10 günün başlangıcında ve 10 günün sonundaki yüzde uzaklaşmayı belirlemek için DOC konsantrasyonunu saptayın. Her belirleme için sadece minimum hacimde test süspansiyonu alın.

Örneklemeden önce eğer gerekli ise seyreltme suyu ekleyerek iyi bir şekilde kayıplarını giderin. Örnek almadan önce kültür ortamını tamamen karıştırın ve örneklemeden önce kabın duvarlarına tutunmuş maddenin çözündüğünden veya çözelti içine geçtiğinden emin olun. Örnek alındıktan hemen sonra hemen süzme membranı kullanın veya santrifüjleyin. Süzülmüş veya santrifüjlenmiş örneği aynı gün analiz edin, aksi takdirde 2-4 °C' de maksimum 48 saat depolayın, uzun süreli saklamalar için -18 °C veya daha düşük sıcaklıklarda depolayın.

II.3 Veriler ve raporlama

II.3.1 Sonuçların işlenmesi

t zamanındaki bozunma yüzdesini, I.7.1 (DOC' un belirlenmesi) ve isteğe bağlı olarak I.7.2 de verildiği gibi hesaplayın.
Sağlanan veri formuna sonuçları kaydedin.

II.3.2 Sonuçların geçerliliği

Bakınız I.5.2

II.3.3 Raporlama

Bakınız I.8

II.4 Veri formu

Veri formunun bir örneği aşağıda verilmektedir.

DOC DIE-AWAY TESTİ

1. LABORATUVAR
2. TESTİN BAŞLANGIÇ TARİHİ
3. TEST MADDESİ
   İsim:
   Stok çözelti konsantrayonu: kimyasal olarak mg/ml
   Ortamdaki ilk konsantrasyon: kimyasal olarak mg/ml

4. AŞI
   Kaynak:
   Yapılan işlemler:
   Varsa ön şartlandırma:
   reaksiyon karışımındaki askıda katı maddelerin konsantrasyonu: mg/l
5. KARBON TAYİNLERİ
   Karbon analiz cihazı:

	Kap no.		n gün sonra DOC (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test kimyasalı artı aşı	1	a_1					
		a_2					
		a, ortalama $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, ortalama $C_{b(t)}$					
Test kimyasalı olmadan kör aşı	3	c_1					
		c_2					
		c, ortalama $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, ortalama $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. HAM VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kap no.		n gün sonra % bozunma				
		0	n_1	n_2	n_3	
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
Ortalama (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Eğer dikkate alınacak kadar fark varsa D1 ve D2 ortalaması alınmamalıdır.
Not: Referans kimyasal ve toksisite kontrolleri çin benzer formatlar kullanılabilir

7. ABİYOTİK KONTROL (isteğe bağlı)

	Zaman (Günler)	
	0	t
Steril kontrol içindeki DOC derişimi (mg/l)	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiyotik bozunma} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. SPESİFİK KİMYASAL ANALİZİ (isteğe bağlı)

	Test sonunda test kimyasalı kalıntı miktarı (mg/l)	% birincil bozunma
Steril kontrol	S_b	
Aşılanmış test ortamı	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

BÖLÜM III. DEĞİŞTİRİLMİŞ OECD TARAMA TESTİ (Yöntem C.4-B)

III.1 Test yönteminin ilkesi

Test maddesinden (10-40 mg DOC/litre) bilinen miktarlarda içeren, hacmi ölçülmüş mineral ortamı nominal tek organik karbon kaynağı olarak 1 litre ortam hacmi başına 0,5 ml atıksu ile aşılanır. Karışım 22±2 °C de dağıtılmış ışık altında veya karanlıkta havalandırılır.

Bozunma, 28 günlük sürede, sık aralıklarla DOC analizi ile takip edilir. Biyolojik bozunma derecesi, uzaklaştırılan DOC konsantrasyonun (kör aşı için düzeltilen) ilk başta bulunan konsantrasyondaki yüzde oranı olarak ifade edilir. Esas biyolojik bozunma derecesi inkübasyonun başında ve sonunda yapılan tamamlayıcı kimyasal analizden de hesaplanabilir.

III.2 Test yönteminin tanımlanması

III.2.1 Düzenek

(a) Konik cam balonlar, örneğin, DOC analizinde ihtiyaç duyulan hacime bağlı olarak 250 ml den 2 litreye kadar;
(b) Çalkalama makinesi – konik cam balonları yerleştirmek için, ya otomatik sıcaklık kontrollu ya da sabit sıcaklık odasında kullanılan ve bütün cam balonlarda havalandırma şartlarını sağlamak için yeterli güçte;
(c) Süzme düzeneği, uygun membranlı
(d) DOC analiz cihazı;
(e) Çözünmüş oksijen miktarını belirlemek için düzenek;
(f) Santrifüj

III.2.2 Mineral ortamının hazırlanması

Stok çözeltilerinin hazırlanması için, bakınız I.6.2

10 ml (a) çözeltisini 80 ml seyreltme suyuyla karıştır, (b) çözeltisinden 1 ml (d) çözeltisine ekle ve seyreltme suyuyla 1 litreye tamamla.
Bu metod aşı olarak sadece 0,5 ml atıksu/litre kullanır ve buyüzden ortam eser elementlerle ve büyüme faktörleri ile güçlendirilmeye ihtiyaç duyabilir. Bu işlem son ortama aşağıdaki çözeltilerin herbirinden 1 ml eklenmesi ile yapılır:

Eser element çözeltisi:

Manganez sülfat tetrahidrat, $MnSO_4.4H_2O$	39,9 mg
Borik asit, H_3BO_3	57,2 mg
Çinko sülfat heptahidrat, $ZnSO_4.7H_2O$	42,8 mg
Amonyum heptamolibdat $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-şelat ($FeCl_3$ etilendiamin-tetra-asetik asit)	100,0 mg

çözün, seyreltme suyu içinde 1000 ml'ye tamamlayın.

Vitamin çözeltisi:
Maya özütü 15.0 mg
Maya özütünü 100 ml su içinde çözün. 0,2 mikronluk membranlardan geçirerek sterilize edin, veya taze olarak hazırlayın.

III.2.3 Aşının ön-şartlandırması ve hazırlanması

Aşı, baskın olarak evsel atık sulardan beslenen atık su arıtma tesislerinin veya laboratuvar ölçekli arıtma birimlerden alınan ikincil atıksulardan elde edilir. Bakınız I.6.4.2 ve I.6.5 mineral ortamın litresi başına 0,5 ml kullanılır.

III.2.4 Cam balonların hazırlanması

Örnek olarak, mineral ortamının 800 ml' lik kısmını 2 litrelik kaplara koyunuz ve test ve referans maddesinin stok çözeltilerinden yeterli hacimde konik cam balonlara, kimyasal konsantrasyonu 10-40 mg DOC/litreye eşdeğer olacak şekilde, farklı kaplara ekleyin. pH değerini kontrol edin, eğer gerekliyse 7,4' e ayarlayın. Cam balonları kanalizasyon atık suyu ile 0,5 ml/litre olacak şekilde aşılayın (bakınız I.6.4.2). Ayrıca test ve referans kimyasalı içermeyen aşı kontrollerini mineral ortamda hazırlayın.

Gerekli olduğu takdirde, mineral ortamda, hem test hem de referans kimyasalları bakımından karşılaştırılabilir konsantrasyonlar ihtiva eden bir çözelti aşılama yoluyla test kimyasallarının olası yavaşlatıcı (inhibe edici) etkisini kontrol etmek için bir kap kullanın.
Aynı zamanda gerekli olduğu takdirde, bu test aşılanmamış çözeltisini kullanılarak abiyotik olarak bozunmaya uğrayıp uğramadığını kontrol etmek için başka steril cam balon kullanın.(I.6.6. bölüme bakınız)

Buna ilaveten, test kimyasalının cam, atık su vb. tarafından kayda değer oranda adsorplandığından şüphe ediliyorsa, olası adsorpsiyon var olup olmadığını ve böylelikle kimyasal madde için testin uygunluğunu belirlemek için bir ön değerlendirme yapın (Tablo 1'e bakınız). Test maddesi, aşı ve sterilize edici madde ihtiva eden bir cam balon hazırlayın.

Tüm cam balonlardaki hacimleri (miktarları) mineral ortamla birlikte 1 L yapınız ve karıştırdıktan sonra DOC'nin ilk konsantrasyonunu saptamak için her bir cam balondan örnekler alınız (Ek-II.4'e bakınız.) Cam balonların ağızlarını örneğin alüminyum folye ile cam balon ve çevreleyen atmosfer arasında serbest hava geçişine izin verecek şekilde kapatınız. Daha sonra testi başlatmak için kapları çalkalama düzeneğine yerleştiriniz.

III.2.5 Tipik çalışmada cam balon numaraları

Kap 1 ve 2: Test süspansiyonu
Kap 3 ve 4: Kör aşı
Kap 5: İşlem kontrolu

ve tercihen ve gerekli olduğunda:
Kap 6 : Abiyotik steril kontrolu
Kap 7: Adsorpsiyon kontrolu
Kap 8: Toksisite (Zehirlilik) kontrolu
Ayrıca bakınız1.6.7.

III.2.6 Testin performansı

Test boyunca, bilinen zaman aralıklarında tekrarlayarak, yeterince sıklıkla 10 günün başlangıcında ve 10 günün sonundaki uzaklaşma yüzdesini belirlemek için DOC konsantrasyonunu belirleyin. Her belirleme için sadece minimum hacimde test süspansiyonu alın.

Örneklemeden önce eğer gerekli ise seyreltme suyu ekleyerek iyi bir şekilde buharlaşma kayıplarını giderin. Örnek almadan önce kültür ortamını tamamen karıştırın ve örneklemeden önce kabın duvarlarına tutunmuş maddenin çözündüğünden veya çözelti içine geçtiğinden emin olun. Örnek alındıktan hemen sonra hemen süzme membranı kullanın veya santrifüjleyin. Süzülmüş veya santrifüjlenmiş örneği aynı gün analiz edin, aksi takdirde 2-4 °C' de maksimum 48 saat depolayın, uzun süreli saklamalar için -18 °C veya daha düşük sıcaklıklarda depolayın.

III.3 Veriler ve raporlama

III.3.I Sonuçların işlenmesi

t zamanındaki bozunma yüzdesini, I.7.1 (DOC' un belirlenmesi) ve isteğe bağlı olarak I.7.2 de verildiği gibi hesaplayın.
Sağlanan veri formlarına sonuçları kaydedin.
III.3.2 Sonuçların geçerliliği

Bakınız I.5.2

III.3.3 Raporlama

Bakınız I.8

III.4 Veri formu

Veri formunun bir örneği aşağıda verilmektedir.

DOC DIE-AWAY TESTİ

1. LABORATUVAR
2. TESTİN BAŞLANGIÇ TARİHİ
3. TEST MADDESİ
   İsim:
   Stok çözelti konsantrayonu: kimyasal olarak mg/ml
   Ortamdaki ilk konsantrasyon: kimyasal olarak mg/ml
4. AŞI
   Kaynak:
   Yapılan işlemler:
   Varsa ön şartlandırma:
   reaksiyon karışımındaki askıda katı maddelerin konsantrasyonu: mg/l
5. KARBON TAYİNLER

Karbon analiz cihazı:

	Kap no.		n gün sonra DOC (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test kimyasalı artı aşı	1	a_1					
		a_2					
		a, ortalama $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, ortalama $C_{b(t)}$					
Test kimyasalı olmadan kör aşı	3	c_1					
		c_2					
		c, ortalama $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, ortalama $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. HAM VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kap no.		n gün sonra % bozunma				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
Ortalama (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				
(*) eğer dikkate alınacak kadar fark varsa D1 ve D2 ortalaması alınmamalıdır. Not: Referans kimyasal ve zehirlilik kontrolleri çin benzer formatlar kullanılabilir.						

7. ABİYOTİK KONTROL (isteğe bağlı))

	Zaman (Günler)	
	0	t
Steril kontrol içindeki DOC derişimi (mg/ml)	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\ \text{abiyotik bozunma} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. SPESİFİK KİMYASAL ANALİZİ (isteğe bağlı)

	Test sonunda test kimyasalı kalıntı miktarı (mg/l)	% birincil bozunma
Steril kontrol	S_b	
Aşılanmış test ortamı	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

BÖLÜM IV. CO_2 DEĞİŞİM TESTİ (Yöntem C.4-C)

IV.1 Test yönteminin ilkesi

Ölçülmüş miktarda aşı mineral ortamı içeren, bilinen derişimdeki test kimyasalı (10-20 mg DOC veya TOC/litre) tek organik karbon kaynağı olarak kontrollu bir hızla karanlıkta veya dağınık ışıkta karbon dioksit içermeyen hava ile havalandırılır. Bozunma baryum veya sodyum hidroksit içinde yakalanan ve kalıntı hidroksitin titrasyonu veya inorganik karbon olarak ölçülen karbon dioksitin belirlenmesi ile 28 günlük süre boyunca takip edilir. Test kimyasalından (kör aşıdan türetilen için doğrulanmış) üretilen karbondiksit miktarı yüzde $ThCO_2$ olarak ifade edilir. Biyolojik bozunma derecesi inkübasyonun başlangıcında ve sonunda yapılan tamamlayıcı DOC analizinden hesaplanabilir.

IV.2 Test yönteminin tanımlanması

IV.2.1 Düzenek

(a) 2-5 litrelik kaplar, herbiri hemen hemen kabın dibine ve çıkışına uzanan havalandırma tüpüyle tutturulmuş;
(b) manyetik karıştırıcılar, az çözünen kimyasalları belirlerken;
(c) Gaz soğurma (absorpsiyon) şişeleri
(d) Hava akışını kontrol eden ve ölçen cihaz;
(e) karbon dioksit içermeyen havayı hazırlamak, karbon dioksit temizlemek için düzenek; alternatif olarak gaz silindirlerinden CO_2 içermeyen oksijen ve CO_2 içermeyen azot karışımı doğru oranlarda (% 20 O2 : % 80 N2) kullanılabilir;
(f) Karbon dioksitin belirlenmesi için cihaz, ya titrimetrik olarak ya da inorganik karbon analiz cihazının bazı çeşitleri;
(g) Membran tipi süzme cihazı (isteğe bağlı);
(h) DOC analiz cihazı (isteğe bağlı).

IV.2.2 Mineral ortamının hazırlanması

Stok çözeltilerinin hazırlanması için, bakınız I.6.2
10 ml (a) çözeltisini 800 ml seyreltme suyuyla karıştır, (b) çözeltisinden 1 ml (d) çözeltisine ekle ve seyreltme suyuyla 1 litreye tamamla.

IV.2.3. Aşının hazırlanması ve ön şartlandırılması
Aşı çok şeşitli kaynaklardan elde edilebilir: aktif kanalizasyon atıksuyu çamur; lağım atıkları; yüzey suları; toprak veya bunların karışımlarından.

Bakınız I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ve I.6.5

IV.2.4 Cam balonların hazırlanması

Aşağıda örnek olarak verilen ağırlıklar ve hacimler 3 L süspansiyon içeren 5 litrelik kapları gösterir. Eğer daha düşük hacimler kullanılırsa değerleri ona göre değiştirin, fakat oluşan karbon dioksitin doğru bir şekilde ölçülebildiğinden emin olun.

Her 5-litrelik kap için 2400 ml mineral ortamdan ekleyin. Asılı katı partiküllerin derişimini, son aşılanmış karışımın 3 litresinde 30 mg/l den fazla olmayacak şekilde hazırlanmış aktif çamurdan uygun hacimde ekleyin. Alternatif olarak, 30 mg/l derişimi elde etmek için 5 litrelik kap içerisine madde eklemeden önce, ilk olarak mineral ortamında 500-1000 mg/l süspansiyon verecek şekilde aktif çamuru seyreltin; bu daha yüksek kesinliği garanti altına alır. Diğer aşı kaynaklarıda kullanılabilir (Bakınız I.6.4.2).
Karbon dioksit içeriğini temizlemek için aşılanmış karışımları CO_2 içermeyen hava ile gece boyunca havalandırın.

10 ile 20 mg arasında DOC ceya TOC/L eklenen kimyasal payı ile istenen derişimlere ulaşmak, kap sayısını çoğaltmak için bilinen hacimdeki stok çözeltilerden, test maddesini ve referans maddesini ayrı ayrı ekleyin; Aşı kontrolu olarak bazı kapları kimyasalları eklemeden bırakın. Zor çözünen test maddelerini Ek-III' de açıklandığı gibi ağırlık ve hacim temeline veya elleclemeye göre, kaplara direk olarak ekleyin.

Eğer gerekiyorsa, diğer kaplarda benzer konsantrasyonlarda olan test ve referans kimyasallarının her ikisinden eklenmesiyle test kimyasalının mümkün olan inhibitör etkisini kontrol etmek için bir kap kullanın.

Hatta gerekiyorsa test kimyasalının abiyotik olarak bozunduğunu kontrol etmek için kimyasalın aşılanmamış çözeltisini (Bakınız I.6.6) içeren steril bir kap kullanın.

Uygun derişimde toksik (zehirli) madde koyarak sterilize edin.

Daha önce CO_2 içermeyen hava ile havalandırılmış mineral ortam eklemesiyle, tüm kaplardaki süspansiyon hacimlerini 3 L'ye tamamlayın. İsteğe bağlı olarak DOC (bakınız Ek-II.4.) analizi ve/veya spesifik analiz için örnekler alınabilir. Absorpsiyon (sogurma) şişelerini kapların hava çıkışlarına bağlayın.

Eğer baryum hidroksit kullanılırsa, her biri 100 ml 0,0125 M baryum hidroksit çözeltisinden içeren üç absorpsiyon şişesinin herbirini seri olarak 5 litrelik cam balona bağlayın. Çözelti çökmüş sülfat ve karbonat içermemelidir ve şiddeti kullanmdan hemen önce belirlenmelidir. Eğer sodyum hidroksit kullanılırsa, iki tutucu bağlayın, ikincis tutucu karbon dioksitin ilk tutucuda tamamen absorblandığını göstermek için kontrol amaçlı kullanılır. serum şişesi kapaklarıyla oturtulmuş absorbsiyon şişeleri uygundur. Her şişeye, test kimyasalı tamamen bozunduğunda açığa çıkan toplam karbon dioksitin miktarını absorblamak için yeterli olan 200 ml 0,05 M sodyum hidroksit ekleyin. Sodyum hidroksit çözeltisi, taze olarak hazırlandığında bile, eser miktarda karbonat içerecektir; bu körteki karbonatın düşülmesi ile düzeltilecektir.

IV.2.5 Tipik bir uygulamada cam balon sayısı
Kap 1 ve 2: Test süspansiyonu
Kap 3 ve 4: Kör aşı
Kap 5: İşlem kontrolu
ve tercihen ve gerekli olduğunda
Kap 6: Abiyotik steril kontrolü
Kap 7: Toksisite Testinin performansı

Teste, süspansiyondan 30-100 ml/min hızında CO_2 içermeyen hava geçirerek başlayın. CO_2 miktarının analizi için, karbon dioksit soğurucusundan periyodik olarak örnek alın. İlk on günlük sürede, analizler iki ve üç günlük aralarda ondan sonra 28. güne kadar beş günde bir yapılmalı, böylelikle 10 günlük çalışma süresi tanımlanabilir.

28. günde, DOC ve/veya spesifik analiz için örnekler alın, süspansiyonların pH' ını ölçün ve her kaba 1 ml derişik hidroklorik asit ekleyin; test süspansiyonu içinde bulunan karbon dioksiti uzaklaştırmak için gece boyunca kapları havalandırın. 29 ncu günde açığa çıkan karbon dioksit için son analizi yapın.

CO_2 ölçüm günlerinde, kaba yakın olan baryum hidroksit soğurucu bağlantısını kesin ve fenol ftalein'i indikatör olarak kullanarak, hidroksit çözeltisini 0,05 M HCl ile titre edin. Geriye kalan soğuruculardan ilkini kaba yakın olan bir yere yerleştirin ve 100 ml taze 0,0125 M baryum hidroksit içeren yeni bir soğurucuyu serinin en sonuna yerleştirin. Gerektiği zaman titrasyon yapın, örneğin, ilk tutucu fazla çökelti görüldüğünde, ikincide ortada henüz bişey yokken veya en az haftalık olarak. Alternatif olarak, soğurucu olarak NaOH kullanıldığında, cam balonun yakınındaki soğurucudaki sodyum hidroksit çözeltisinden şırınga ile küçük bir

örnek alın (kullanılan karbon analiz cihazının özelliğine bağlı olarak). Açığa çıkan karbon dioksitin direk analizi için, örneği karbon analiz cihazının IC (inorganik karbon) kısmına enjekte edin.

Herhangibir karbon dioksit düzeltimi için İkinci tutucunun içeriğini sadece testin sonunda analiz edin.

IV.3 Veriler ve raporlama

IV.3.1 Sonuçların işlenmesi

Soğurucuda yakalanan CO_2 titrasyon yapıldığında şu şekilde verilir:

$$mg\ CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

burada:
V= soğurucudaki 100 ml' nin titrasyonu için kullanılan HCl hacmi (ml),
C_B= Baryum hidroksit çözeltisin derişimi (M),
C_A= hidroklorik asit çözeltisinin derişimi (M),

Eğer C_B 0,0125 M ve C_A 0,05 M ise, 100 ml baryum hidroksit için titrasyon 50 ml' dir ve CO_2 ağırlığı şu şekilde verilir:

(0,05/2) x 44 x titrasyon yapılan ml HCl = 1,1 x ml HCl

Böylece, bu durumda, üretilen mg CO_2 için titrasyon yapılan HCl hacmini çevirmek için faktör 1,1 dir.

Yalnız aşıdan ve aşı artı test kimyasalından kendi titrasyon değerlerini kullanarak elde edilen CO_2 ağırlığını hesaplayın, fark sadece test kimyasalından üretilen CO_2 ağırlığıdır.

Örneğin, Sadece aşı 48 ml titrasyon verirse ve aşı artı test kimyasalı 45 ml verirse,
aşıdan gelen CO_2 = 1,1 x (50-48) = 2,2 mg
Aşı artı test kimyasalından gelen CO_2 = 1,1 x (50-45) = 5,5 mg
Ve böylece test kimyasalından elde edilen CO_2 ağırlığı 3,3 mg olur.

Yüzde biyolojik bozunma şu şekilde hesaplanır:

% bozunma = (mg CO_2 üretilen x 100)/($ThCO_2$ x eklenen mg test kimyasalı)

veya,

% bozunma = (mg CO_2 üretilen x 100)/(testde eklenen mg TO x 3,67)

3,67, karbon dioksitin karbona oranı (44/12), karbonun karbondioksite dönüşüm faktörüdür.

Ölçüldüğü zamana kadar, herhangibir zaman aralığında hesaplanan yüzde $ThCO_2$ değerleri eklendikten sonra, yüzde bozunmayı elde edin.

Sodyum hidroksit soğurucuları için, IC (inorganik karbon) (mg) şeklinde ifade edilen üretilen karbon dioksit miktarını, soğurucunun hacmi ile soğurucudaki, IC konsantrasyonunu çarparak hesaplayın.

Yüzde bozunmayı şu şekilde hesaplayın:

$ThCO_2$ yüzdesi = (cam balondaki mg IC – körteki mg IC x 100)/(Test kimyasalı olarak eklenen mg TOC)

Uzaklaştırılan DOC miktarını I.7 altında açıklandığı gibi hesaplayın (isteğe bağlı). Bunları ve diğer sonuçları sağlanan veri formlarına kayıt edin.

IV.3.2 Sonuçların geçerliliği

Test kimyasalı süspansüyonunun, test başlangıcındaki mineral ortamı içindeki IC içeriği TC' nin % 5' inden az olmalı ve test sonunda kör aşıdaki toplam CO_2 değişimi normal olarak 40 mg/l ortam değerini geçmemelidir. 70 mg CO_2 /litreden daha büyük değerler elde edilirse, elde edilen veriler ve deneysel yöntem kritik olarak incelenmelidir.

Ayrıca bakınız I.5.2.

IV.3.3. Raporlama

Bakınız I.8

IV.4 Veri formu

Veri formunun bir örneği aşağıda verilmektedir.

KARBON DİOKSİT DÖNÜŞÜM TESTİ

1. LABORATUVAR
2. TESTİN BAŞLANGIÇ TARİHİ
3. TEST MADDESİ
   İsim:
   Stok çözelti konsantrayonu: kimyasal olarak mg/ml
   Ortamdaki ilk konsantrasyon: kimyasal olarak mg/ml
   Kaba eklenen toplam C: mg C
   $ThCO_2$: mg CO_2
4. AŞI
   Kaynak:
   Yapılan işlemler:
   Varsa ön şartlandırma:
   reaksiyon karışımındaki asılı katıların konsantrasyonu: mg/litre

Zaman (gün)	Oluşan CO_2 (mg) test			Elde edilen CO_2 (mg) kör		Oluşan toplam CO_2 (mg) (Test eksi kör ortalaması)		$ThCO_2$ $toplam\ \frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	ortalama		3 / 4	ortalama	1	2	1	2	Ortalama
0										
n_1										
n_2										
n_3										
28										

Not: Referans kimyasallar ve toksisite kontrolleri için benzer formatlar kullanılabilir.

5. KARBON ANALİZİ (isteğe bağlı)

Karbon analiz cihazı:

Zaman (gün)	Kör mg/l	Test kimyasalı mg/l
0	$C_{b(0)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) inkübasyonda veya inkübasyon sonunda		

$$\text{uzaklaştırılan \% DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}}\right)$$

6. ABİYOTİK BOZUNMA (isteğe bağlı)

$$\text{\% abiyotik bozunma} = \frac{\text{28 günden sonra steril kaptaki } Co_2 \text{ oluşumu (mg)}}{ThCO_2\text{(mg)}} \text{ x } 100$$

BÖLÜM V. MANOMETRİK RESPİROMETRE TESTİ (Yöntem C.4-D)

V.1 Test yönteminin ilkesi

Ölçülmüş hacimdeki tanımlanmış tek organik karbon kaynağı olarak bilinen derişimde test kimyasalı (en az 50-100 mg ThOD/litre vermek için test maddesinin 100 mg/litresi) içeren, aşılanmış mineral ortamı 28 günün sonuna kadar sabit sıcaklıkta (±1 °C veya daha yakın) karıştırılır. Okisjen tüketimi, ya sabit gaz hacminin korunmasını gerektiren respirometre kabında oksijen miktarının (elektroliz yöntemiyle üretilen) ölçülmesiyle ya da düzenek içindeki hacim veya basınç (veya ikisinin kombinasyonunun) değişiminden elde edilir. Açığa çıkan karbon dioksit, potasyum hidroksit çözeltisine veya diğer uygun soğurucuya soğurulur. Test kimyasalı (alınan oksijen parallel yürütülen kör aşı ile karşılaştırılarak düzeltilmiş) tarafından alınan oksijen miktarı ThOD veya COD yüzdesi olarak ifade edilir. İsteğe bağlı olarak birincil bozunma, inkübasyonun başında ve sonunda yapılan tamamlayıcı özel analizlerle ve DOC analizi ile nihai biyolojik bozunmadan hesaplanabilir.

V.2.1. Test yönteminin tanımlanması

V.2.1. Düzenek

(a) uygun respirometre;
(b) ±1 °C veya daha iyi hassasiyette sıcaklık kontrolu;
(c) membranlı süzme düzeneği (isteğe bağlı);
(d) Karbon analiz cihazı (isteğe bağlı).

V.2.2 Mineral ortamının hazırlanması

Stok çözeltilerinin hazırlanması için, bakınız I.6.2
10 ml (a) çözeltisini 800 ml seyreltme suyuyla karıştırın, (b) çözeltisinden 1 ml (d) çözeltisine ekleyin ve hacmi seyreltme suyuyla 1 litre yapın.

V.2.3. Aşının hazırlanması ve ön şartlandırması

Aşı farklı birçok kaynaktan türetilebilir: aktif çamur; kanalizasyon atıkları, yüzey suları ve topraktan veya bunların karışımlarından.

Bakınız I.6.4, I.6.4, I.6.4.2 Kapların hazırlanması
Test ve referans kimyasallarının çözeltilerini, stok çözeltilerini kullanarak mineral ortamı içinde, normal olarak konsantrasyon 100 mg kimyasal/litreye (en az 50-100 mgThOD/litreyi verecek şekilde) eşit ayrı ayrı seriler halinde hazırlayın.
Hesaplama nitrat oluşumuna dayandırıldığında (Bakınız Ek-II.2) nitratlaşma umulmuyorsa, ThOD' yi amonyum tuzlarının oluşumuna dayandırarak hesaplayın.
pH değerlerini belirleyin, eğer gerekliyse 7,4±0,2' ye ayarlayın
Az çözünen maddeler daha sonraki bölümlerde eklenebilir (bakınız aşağıda).

Eğer test kimyasalının toksisitesi belirlenecekse, kendi çözeltilerinde olduğu gibi mineral ortam içinde aynı derişimlerde hem test hemde referans maddesi içeren başka bir çözelti hazırlayın.
Eğer fizikokimyasal oksijen alımının ölçülmesi gerekliyse, uygun toksik madde (Bakınız I.6.6) eklenerek sterilize edilmiş normal olarak 100 mg ThOD/litrede bir test kimyasal çözeltisi hazırlayın.
En az iki cam balona, test ve referans maddesi çözeltisinden sırasıyla gerekli miktarda koyun. Başka kaplara sadece mineral ortamı (aşı kontrol için) koyun ve gerekliyse test/referans kimyasal çözeltisi ve steril çözeltisini karıştırın.
Eğer test kimyasalı az çözünen bir madde ise, bu kısımda ağırlık veya hacim temeline göre doğrudan ekleyin veya Ek-III'e göre işlem yapınız. CO_2 soğurucu ortamlara sodyum hidroksit, sönmemiş kireç veya diğer soğurucuları koyun.

IV.2.5 Tipik bir uygulamadaki cam balon sayısı
Kap 1 ve 2: Test süspansiyonu
Kap 3 ve 4: Kör aşı
Kap 5: İşlem kontrolu
ve tercihen ve gerekli olduğunda:
Kap 6 : Steril kontrolu
Kap 7: Toksisite kontrolu

Ayrıca bakınız 1.6.7.

V.2.6. Testin performansı

Kapların istenen sıcaklığa ulaşmasına izin verin ve hazırlanmış aktif çamur veya diğer aşı kaynakları ile asılı katıların derişimi 30 mg/litreden daha fazla olmayacak şekilde uygun kapları aşılayın. Cihazı kurun, karıştırıcıyı başlatın ve hava geçirmezliğini kontrol edin ve oksijen alımı ölçümünü başlatın. Çoğunlukla gerekli okumaları yapmak, doğru sıcaklık ve yeterli karıştırmanın sağlanmasını günlük kontrol etmek dışında dikkat gerektiren başka bir şey yoktur.

Sık ve düzenli yapılan okumalarla, cihaz üreticisi tarafından verilen metodları kullanarak oksijen alınımını hesaplayın. 28 günlük normal İnkübasyon sonunda özellikle eğer oksijen alımı $ThODNH_4$' den (azot içeren bileşikler için) düşükse veya büyükse, kap içeriklerinin pH' ını ölçün.

Eğer gerekliyse, DOC ve spesifik kimyasal (bakınız Ek-II.4) analizi için başında ve sonunda respirometre kaplarından örnekler alın. İlk alımda, kapta kalan test süspansiyonunun hacminin bilindiğinden emin olun. Oksijen, N-içeren test maddesi tarafından alındığında 28 gün boyunca nitrit ve nitrat derişimindeki artışı belirleyin ve nitratlaşma ile tüketilen oksijen için düzeltmeyi hesaplayın.

V.3 Veriler ve raporlama

V.3.1 Sonuçların işlenmesi

Belirlenen zamandan sonra test kimyasalının oksijen alımını (aynı zaman sonunda kör aşı kontrollu için düzeltilen) kullanılan test kimyasalının ağırlığıyla bölün.
sonuç mg oksijen/mg test maddesi olarak ifade edilen BOD' u verir. Şu şekildedir:
BOD = (test kimyasalı tarafından alınan mg O_2 – kör tarafından alınan mg O_2)/ (cam balondaki mg test kimyasalı)= mg test kimyasalı başına mg O_2.

Aşağıdaki eşitlikten yüzde biyolojik bozunmayı:
% biyolojik bozunma=%ThOD=BOD (mg O_2/mg kimyasal) x 100/ ThOD (mg O_2 kimyasalı)
ya da buradan

%COD=BOD (mg O2/mg kimyasal) x 100)/COD (mg O2 kimyasalı)hesaplayın.

Bu iki yönteminda aynı değeri verme gerekliliğinin olmadığına dikkat edilmelidir; ilk yöntemin kullanılması tercih edilir.

Azot içeren test maddeleri için, nitratlaşma oluşumu (Ek-II.2) hakkında bilgi sahibi olunan veya tahmin edilen, uygun ThOD (NH_4 veya NO_3) kullanın. Eğer nitratlaşma tamamlanmadan gerçekleşirse, nitratlaşma ile tüketilen oksijen miktarını nitrit ve nitrat (Ek-V) miktarındaki değişmeden düzeltmeyi hesaplayın.

Organik karbonun ve/veya özel kimyasalın isteğe bağlı belirlemesi yapıldığında, I.7. altında açıklandığı gibi yüzde bozunayı hesaplayın.

Eklenen veri formlarına bütün sonuçları kaydedin.

V.3.2. Sonuçların geçerliliği

Normal olarak 20-30 mg/litre olan kör aşı oksijen alımı 28 gün içinde 60 mg/litreden fazla olmamalıdır. 60 mg/litreden yüksek olan veriler, verilerin ve denysel tekniklerin kritik incelemesini gerektirir. Eğer pH değeri 6-8,5 aralığının dışındaysa ve test kimyasalı tarafından oksijen tüketimi % 60' dan az ise, daha düşük derişimdeki test kimyasalı ile test tekrarlanmalıdır.

Ayrıca bakınız I.5.2

V.3.3 Raporlama

Bakınız I.8

V.4. Veri formu

Veri formunun bir örneği bu aşağıda verilmektedir.

MANOMETRİK RESPİROMETRE TESTİ

1. LABORATUVAR
2. TESTİN BAŞLANGIÇ TARİHİ
3. TEST MADDESİ
   İsim:
   Stok çözelti konsantrayonu: mg/ml
   Ortamdaki ilk konsantrasyon, C_0: mg/ml
   Test kabındaki hacim (V): ml
   ThOD veya COD: mg O_2/mg test maddesi (NH_4 veya NO_3)
4. AŞI
   Kaynak:
   Yapılan işlemler:
   Varsa ön şartlandırma:
   reaksiyon karışımındaki asılı katıların konsantrasyonu: mg/l

5. OKSİJEN ALIMI : BİYOLOJİK BOZUNABİLİRLİLİK

		Zaman (Günler)									
		0		7		14			21		28
O_2 alımı (mg) Test kimyasalı	1										
	2										
	a, ortalama										
O_2 alımı (mg) Kör	3										
	4										
	b, ortalama										
Düzeltilmiş BOD (mg)	(a_1-b_m)										
	(a_2-b_m)										
mg Test kimyasalı başına BOD	$\frac{a_1-b}{C_0V}$										
	$\frac{a_2-b}{C_0V}$										
% bozunma $\frac{BOD}{ThOD}\times 100$	$D_1(a_1)$										
	$D_2(a_2)$										
	Ortalama*										

V= Test kabındaki ortalama hacim

* Eğer önemli bir fark var ise D_1 ve D_2 ortalaması alınmamalıdır.

N.B. : Kimyasal referans ve tosisite kontrolleri için benzer format kullanılabilir.

6. NİTRATLAŞMA İÇİN DÜZELTME (Bakınız EK- V)

Gün	0	28	Fark
(i) Nitrat Derişimi (mg N/litre)	-	-	
(ii) Eşdeğer Oksijen (4,57 x N x V)(mg)	-	-	
(iii) Nitrit Derişimi (mg N/litre)	-	-	(N)
(iv) Eşdeğer Oksijen (3,43 x N x V)(mg)	-	-	(N)
(ii + iv) Toplam Eşdeğer Oksijen			

7. KARBON ANALİZİ (isteğe bağlı)
Karbon analiz cihazı:

Zaman (Gün)	Kör mg/litre	Test kimyasalı mg/litre
0	(C_{blo})	(C_o)
28*	(C_{blt})	(C_t)
* veya inkubasyon sonunda		

$$\text{uzaklaştırılan \% DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}}\right)$$

8. ÖZEL KİMYASAL (isteğe bağlı)
S_b = 28 günde fizikokimyasal (steril) kontrol içindeki derişim
S_a = 28 günde aşılanmış kap içindeki derişim,

$$\text{\% biyobozunma} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABİYOTİK BOZUNMA (isteğe bağlı)
a = 28 gün sonrasında steril kaplardaki oksijen tüketimi, (mg)

$$\text{mg test kimyasalı başına oksijen tüketimi} = \frac{a \times 100}{C_0 V}$$

(Bakınız bölüm 1 ve 3)

$$\text{\% abiyotik bozunma} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times \text{ThOD}}$$

BÖLÜM VI. KAPALI ŞİŞE TESTİ (Yöntem C.4-E)

VI.1 Test yönteminin ilkesi

Çoğunlukla 2-5 mg/litredeki mineral ortamındaki test maddesi çözeltisi, karanlıkta ve sabit sıcaklıkta tamamen kapalı şişelerde tutulan, karışık popülasyondan, nispeten çok küçük sayıda mikro-organizma ile aşılanır. 28 günlük sürede, çözünmüş oksijen analizi ile bozunma takip edilir. Test kimyasalı tarafından alınan oksijen paralel olarak yürütülen kör aşı tarafından alınan oksijen ile karşılaştırılarak düzeltilir ve ThOD veya COD yüzdesi olarak ifade edilir.

VI.2 Test yönteminin tanımlanması

VI.2.1. Düzenek

(a) cam kapakları ile birlikte BOD şişeleri, örenğin 250-300 ml;
(b) şişeleri sabit sıcaklıkta (±1 °C veya daha iyi) tutmak için ışığı içine alamayan su banyosu veya inkübatör;
(c) ortamın hazırlanması için ve BOD şişelerinin doldurulması için geniş cam şişeler (2-5 litrelik);
(d) okisjen elektrodu ve oksijen metre, veya Winkler titrasyonu için ekipman ve reaktifler.

VI.2.2 Mineral ortamının hazırlanması

Stok çözletilerin hazırlanması için, bakınız I.6.2.

1 ml (a) çözeltisini (d) çözeltisi ile karıştırın ve seyreltme suyuyla hacmi 1 litreye tamamlayın.

VI.2.3 Aşının hazırlanması

Normal olarak aşı, ağırlıklı olarak evsel atık su ile beslenen atık su arıtma tesislerinden veya laboratuvar ölçekli arıtma birimlerden alınan ikincil atıksulardan türetilir. Aşının alternatif kaynağı yüzey suyudur. Normal olarak ortam litresi başına 1 damladan (0,05 ml) 5 ml' ye kadar süzüntü suyu kullanın; atıksu için optimum hacmin keşfedilmesi için denemeler yapılması gerekebilir (Bakınız I.6.4.2. ve I.6.5.).

VI.2.4 Kapların hazırlanması

Mineral ortamını en az 20 dakika kuvvetlice havalandırın. Her test serisini aynı seriden türetilmiş mineral ortamda gerçekleştirin. Genellikle ortam test sıcaklığında 20 saat bekledikten sonra kullanıma hazırdır. Kontrol amaçlı olarak çözünmüş oksijen miktarını belirleyin; değer 20 °C' de yaklaşık 9 mg/litre olmalıdır. Hava ile doyurulmuş kabarcık içermeyen ortamın, tüm transfer ve doldurma işlemlerini sifon kullanarak gerçekleştirin.
Eş zamanlı deney serilerinde test ve referans maddesinin belirlenmesi için paralel BOD şişeleri hazırlayın. Kör aşıları da içeren, istenen test aralıklarında örneğin 0, 7, 14, 21 ve 28 gün sonrasında en az çift oksijen tüketimi ölçümü yapılmasına izin verecek şekilde uygun sayıda BOD şişeleri hazırlayın. 10 günlük çalışma süresini tanımlayabileceğimizden emin olmak için daha fazla şişe gerekebilir.

Tamamen havalandırılmış mineral ortamı neredeyse üçte biri dolu olacak şekilde geniş şişelere ekleyin. Son derişim normal olarak 10 mg/litreden fazla olmayacak şekilde test ve referans kimyasalının yeterli miktardaki stok çözeltilerini ayrı ayrı geniş şişelere ekleyin. Başka geniş şişelerde bulunan kör kontrol ortamına kimyasal eklemeyin.

Aşı aktivitesinin sınırlandırılmadığından emin olmak için, BOD şişelerindeki çözünmüş oksijen miktarı 0,5 mg/litrenin altına düşmemelidir. Bu test kimyasalının derişimini 2 mg/litre civarında sınırlandırır. Ancak düşük ThOD' li ve az bozunur bileşikler için, 5-10 mg/litre kullanılabilir. Bazı durumlarda, örneğin 2 ve 5 mg/litrelik iki farklı derişimde test kimyasalının paralel serilerinin kullanılması tavsiye edilir. Normal olarak ThOD, amonyum tuzu oluşumu esasına göre hesaplanır, fakat nitratlaşma bekleniyorsa veya olacağı biliniyorsa, nitrat ($ThOD_{NO3}$: bakınız Ek-II.2) oluşumu esasına göre hesaplayınız. Eğer nitratlaşma tamamlanmamasına rağmen gerçekleştiyse, analiz (Bakınız Ek- V) ile belirlenen nitrit ve nitrat derişimindeki değişimlerden düzeltiniz.

Eğer test kimyasalının toksisitesi araştırılacaksa (örneğin, önceden düşük biyolojik bozunabilirlik değerleri bulunduğunda) başka şişe serileri gereklidir.
Normal olarak son derişimleri diğer geniş şişelerdeki derişimleri ile aynı olan havalandırılmış mineral ortamı ile birlikte test ve referans kimyasalı içeren başka bir geniş şişe hazırlayın (yaklaşık hacminin üçte birine kadar).

İkincil atıksu veya nehir suyu gibi diğer bir kaynakla geniş şişelerdeki çözeltileri aşılayın (bir damla veya yaklaşık 0,05 ml den 5 ml/litreye kadar) (Bakınız I.6.4.2.). Son olarak, karışım

elde etmek için, şişenin dibine ulaşan bir hortum kullanarak, havalandırılmış mineral ortamla çözeltilerin hacimlerini tamamlayın.

VI.2.5 Tipik bir uygulamadaki kap sayısı

Tipik bir uygulamada aşağıdaki şişeler kullanılır:
En az 10 adet test kimyasalı ve aşı içeren (test süspansiyonu),
En az 10 adet sadece aşı içeren (kör aşı)
En az 10 adet referans kimyasalı ve aşı içeren (işlem kontrolu),
ve gerektiği zaman, test kimyasalı, referans kimyasalı ve aşı (toksisite kontrolu) içeren 6 şişe.
10-günlük aralığın tanımlanabileceğinden emin olunsada, bu şişelerin iki katı şişe gerekebilir.

VI.2.6 Testinin yürütülmesi

Hazırlanmış çözletileri hemen, uygun geniş şişenin alt çeyreğinden (dibinden değil) hortumla sıralı BOD şişelerine boşaltın, böylelikle tüm BOD şişeleri tamamen doldurulur. Hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için yavaşça vurun. Winkler veya elektrot metoduyla çözünmüş oksijeni belirlemek için sıfır-zaman şişelerini hemen analiz edin. Şişe içerikleri mangan (II) sülfat ve sodyum hidroksit (ilk olarak Winkler reaktifi) eklenerek Winkler metoduyla daha sonra analiz edilmek üzere muhafaza edilebilir. Winkler yönteminun geriye kalan basamaklarını gerçekleştirmeden önce 24 saatten uzun olmayacak kadar, karanlıkta 10-20 °C' de hidratlanmış mangan (III) oksiti şeklinde sabitlenmiş oksijen içeren kapatılmış şişeleri dikkatlice muhafaza edin. Geriye kalan şişeleri içinde hava kabarcığı kalmadığından emin olacak şekilde kapatın ve 20 °C' de inkübasyon yapın. Kör aşılı ortamın belirlenmesi için her seriye paralel tam seriler eşlik etmelidir. 28 günlük inkübasyon boyunca belirli zaman aralıklarında (en az haftalık) çözünmüş oksijen analizi için tüm seriden en az çift şişe alınmalıdır.

Her 3-4 günde bir yapılan örnekleme, 10 günlük sürenin tanımlanmasına izin vermeliyken, İki kat fazla şişe gerektiren haftalık örnekler 14 günlük süredeki yüzde uzaklaştırmayı değerlendirmeye izin vermelidir.
N-içeren test maddelerinde, herhangi bir nitratlaşma ile ortaya çıkan oksijen alımı için düzeltmeler yapılmalıdır. Bu düzeltmeyi yapmak için, çözünmüş oksijen derişimini belirlemek amacıyla O_2 elektrod yöntemini kullanın ve daha sonra nitrit ve nitrat analizi için BOD şişelerinden örnek alın. Nitrit ve nitrat derrşimindeki artıştan, kullanılan oksijeni hesaplayın (Bakınız EK-V).

VI. VERİLER VE RAPORLAMA

VI.3.1 Sonuçların işlenmesi

İlk önce her zaman aralığından sonra sarfedilen BOD' yi test kimyasalının tükettiği oksijenden (mg O_2/litre) kör aşının tükettiği oksijeni çıkararak hesaplayın. Bu düzeltilmiş tüketim derişimini test kimyasalının derişimine (mg/ml) bölerek spesifik BOD yi mgO_2/mg test kimyasalı olarak bulun. Yüzde biyolojik bozunmayı, spesifik BOD' yi spesifik ThOD' ye (Ek-II.2' ye göre hesaplanmış) veya COD' ye (analiz ile belirlenmiş, bakınız Ek-II.3) bölerek hesaplayın. Böylece:

BOD=(test kimyasalı tarfından alınan mg O_2 – kör tarafından alınan O_2)/ kaptaki mg test kimyasalı(mg test kimyasalı/ mg O_2)

% bozunma = BOD (mg O_2/mg test kimyasalı x 100)/ThOD (mg O_2/mg test kimyasalı)
veya
% bozunma = BOD (mg O_2/mg test kimyasalı x 100)/COD (mg O_2/mg test kimyasalı)

Bu iki yöntemin aynı değeri vermesinin gerekmediğine dikkat edilmelidir; ilk yöntemin kullanılması tercih edilir.

Azot içeren test maddeleri için, nitratlaşma oluşumu (Ek-II.2) hakkında bilgi sahibi olunan veya tahmin edilen, uygun ThOD (NH_4 veya NO_3) kullanın. Eğer nitratlaşma tamamlanmadan gerçekleşirse, nitratlaşma ile tüketilen oksijen miktarını nitrit ve nitrat (EK-V) miktarındaki değişmeden düzeltmeyi hesaplayın.

VI.3.2 Sonuçların geçerliliği

Kör aşı içindeki okisijen tüketimi 28 gün sonrasında 1,5 mg çözünmüş oksijen/litreden fazla olmamalıdır. Bundan fazla değerler deneysel tekniklerin incelenmesini gerektirir. Test şişelerindeki kalıntı oksijen derişimi hiçbir zaman 0,5 mg/litrenin altına düşmemelidir. Bu şekilde düşük oksijen seviyeleri, eğer kullanılan oksijen belirleme metodu, bu düşük seviyeleri doğru olarak ölçebiliyorsa geçerlidir.

Ayrıca bakınız I.5.2

VI.3.3 Raporlama
Bakınız I.8

VI.4 Veri formu

Veri formunun bir örneği aşağıda verilmektedir.

KAPALI ŞİŞE TESTİ
1. LABORATUVAR
2. TESTİN BAŞLANGIÇ TARİHİ
3. TEST MADDESİ
   İsim:
   Stok çözelti konsantrayonu: mg/litre
   Şişedeki ilk konsantrasyon, mg/litre
   ThOD veya COD: mg O_2/mg test maddesi
4. AŞI
   Kaynak:
   Yapılan işlemler:
   Varsa ön şartlandırma:
   reaksiyon karışımındaki derişim: mg/litre

5. DO' NUN ELDE EDİLMESİ

Yöntem: Winkler/elektrod

Kap analizleri

İnkubasyon zamanı (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Kör (kimyasal olmaksızın)	1	C_1				
	2	C_2				
Ortalama	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Test kimyasalı	1	a_1				
	2	a_2				
Ortalama	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Not : Referans bileşik ve toksisite kontrolü için benzer format kullanılabilir.

6. NİTRATLAŞMA İÇİN DÜZELTME (Bakınız Ek-V)

İnkubasyon zamanı (d)	0	n_1	n_2	n_3
(i) Nitrat derişimi (mg N/litre)				
(ii) Nitrat derişimindeki değişim (mg N/litre)	-			
(iii) Eşdeğer oksijen (mg /litre)	-			
(iv) Nitrit derişimi (mg N/litre)				
(v) Nitrit derişimindeki değişim (mg N/litre)	-			
(vi) Eşdeğer oksijen (mg /litre)	-			
(iii + vi) Toplam Eşdeğer Oksijen				

7. DO TÜKETİMİ : % BOZUNMA

	n gün sonrasında tüketim (mg/litre)			
	n_1	n_2	n_3	
KAP 1 : $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KAP 2 : $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KAP 1 : $\%\, D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{test derişimi x ThOD kimyasalı}}$				
KAP 2 : $\%\, D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{test derişimi x ThOD kimyasalı}}$				
$\%\, D \text{ ortalaması}^{*} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Eğer tekrarlar arasında dikkate değer bir fark varsa ortalama almayın.

m_{to} = 0 zamanında kaptaki değer

m_{tx} = x zamanında kaptaki değer

m_{bo} = o zamanında ortalama kör değeri

m_{bx} = x zamanında ortalama kör değeri

Nitratlaşma için düzeltmeyi ayrıca bölüm 6' daki (iii+vi)'den uygulayın.

8. ŞAHİT DO TÜKETİMLERİ

Kör örnek tarafından oksijen tüketimi: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/litre. Bu tüketim testin geçerliliği için önemlidir. 1,5 mg/litreden az olmalıdır.

BÖLÜM VII. M.I.T.I TESTİ (Yöntem C.4-F)

VII.1 Test yönteminin ilkesi

Test kimyasalının, özel olarak büyümüş, intibak etmemiş mikro organizmalar ile aşılanmış, mineral ortamındaki karıştırılan çözeltisi veya süspansiyonu tarafından alınan oksijen, 28 günlük periyot süresince karanlık ve kapalı respirometre içinde 25±1 °C' de otomatik olarak ölçülür. Açığa çıkan karbon dioksit sönmemiş kireç tarafından soğurulur. Biyolojik bozunurluk, oksijen alımının (kör alımı için düzeltilmiş) teorik oksijen alımına (ThOD) yüzdesi şeklinde ifade edilir. Ek olarak esas biyolojik bozunabilirlik yüzdesi inkübasyonun başında ve sonunda yapılan tamamlayıcı özel kimyasal analizlerinden ve isteğe bağlı olarak, DOC analiziyle hesaplanabilir.

VII.2 Test yönteminin tanımlanması

VII.2.1 Düzenek

(a) Normal olarak herbiri 300 ml' lik 6 şişe ve CO_2 soğurucusu koymak için kupalar ile donatılmış otomatik elektrolitik BOD metre veya respirometre;
(b) 25 °C±1 °C ' de veya daha iyi sabit sıcaklık odası ve/veya su banyosu,
(c) Membran süzme düzeneği (isteğe bağlı);
(d) Karbon analiz cihazı (isteğe bağlı).

VII.2.2. Mineral ortamın hazırlanması

Analitik saflıkta reaktifler ve su (I.6.1.) kullanarak, aşağıdaki stok çözeltileri hazırlayınız:

(a) Monopotasyum dihidrojen orto fosfat, KH_2PO_4 8,50 g
Dipotasyum monohidrojen orto fosfat, K_2HPO_4 21,75 g
Amonyum klorür, NH_4Cl 1,70 g
suda çözün ve 1 litreye tamamlayın
Çözeltinin pH değeri 7,2 olmalıdır

(b) Magnezyum sülfat heptahidrat, $MgSO_4.7H2O$ 22,50 g
Suda çöz ve 1 litreye tamamlayın

(c) Susuz Kalsiyum klorür, $CaCl_2$ 27,50 g
Suda çöz ve 1 litreye tamamlayın

(d) Demir (III) klorür hekzahidrat, $FeCl_36H_2O$ 0,25 g
Suda çözün ve 1 litreye tamamlayın

herbir (a), (b), (c) ve (d) çözeltisinden 3 ml alın ve 1 litreye tamamlayın.

VII.2.3 Aşının hazırlanması

Özellikle çok çeşitli kimyasalın kullanıldığı ve salınım yapıldığı alanlardaki, en az 10 farklı bölgeden taze örnekler toplayın. Kanalizasyon atıksu arıtma tesislerinin, endüstriyel atık su arıtma tesislerinin bulunduğu yer, nehirler, göller, denizler gibi bölgelerden 11 çamur örneği, yüzey toprağı, su, vs. toplayın ve birlikte tamamen karıştırın. Yüzen maddeyi uzaklaştırdıktan sonra ve dinlendirildikten sonra sıvı çözeltiyi sodyum hidroksit veya fosforik asitle pH 7±1'e ayarlayın.

Aktif çamuru doldurma-boşaltma kabını doldurmak için uygun hacimde süzülmüş sıvı çözeltiyi kullanın ve sıvıyı yaklaşık 23 ½ saat havalandırın. Havalandırmayı durdurduktan 30 dakika sonra sıvı çözeltinin yaklaşık üçte birini atın ve herbiri % 0,1 glukoz, pepton ve monopotasyum orto fosfat içeren eşit hacimde çözeltiyi çökelmiş maddeye ekleyin ve havalandırmayı yeniden başlatın. Bu işlemi günde bir kere tekrarlayın. Çamur birimi iyi uygulamalara göre işletilmelidir: atık su berrak olmalı, sıcaklık 25±2 °C' de, pH 7±1' de tutulmalı çamur iyi çöktürülmelidir. Tüm zaman boyunca karışımı aerobik olarak muhafaza etmek için yeterli havalandırma yapılmalı, protozoa bulunmalı ve çamurun aktivitesi en az her üç ayda referans maddesine karşı test edilmelidir. En az bir aylık işlem sonrasına kadar çamuru aşı olarak kullanmayın, fakat, dört aydan fazla bir süreden sonra kullanılmamalıdır.

Bundan sonra, 10 bölgeden düzensiz aralıklarla örnek alınabilir, her üç ayda bir.

Taze ve eski çamuru aynı aktivitede korumak için, taze toplanmış 10 kaynak karışımından süzülmüş sıvı çözelti ile kullanılan süzülmüş aktif çamur sıvı çözeltisini eşit hacimde karıştırın ve karışık çözeltiyi yukarıdaki gibi kültürlendirin. Birim beslendikten 18-24 saat sonra aşı olarak kullanmak için çamur alın.

VII.2.4 Cam balonların hazırlanması

Aşağıdaki altı kabı hazırlayın:
No. 1: 100 mg/l' de syreltme suyu içinde test kimyasalı
No. 2,3 ve 4: 100 mg/l' de mineral ortamı içinde test kimyasalı
No. 5: 100 mg/l' de mineral ortamı içinde referans kimyasalı (örneğin anilin)
No. 6: sadece mineral ortamı
Az çözünen test kimyasallarını ağırlık veya hacim esasına göre doğrudan ekleyin veya Ek-III' te açıklandığı gibi ele alın, çözücüler ve emülsüyon yapıcı ajanların kullanımı dışında. CO_2 soğurucuyu, özel kupalar içinde sağlanan kaplara ekleyin. 2, 3 ve 4 no' lu kapların içindeki pH' ı 7,0' ye ayarlayın.

VII.2.5 Testin yürütülmesi

Küçük bir hacimde aşı ile 30 mg/l asılı katı derişimi verecek şekilde no. 2, 3 ve 4 (test süspansiyonu), no. 5 (aktivite kontrol) ve no. 6 (kör aşı) kaplarını aşılayın. Abiyotik kontrol olarak ayrılmış 1 numaralı kaba aşı eklenmemelidir. Donanımı kurun, hava geçirmezliğini kontrol edin, karıştırıcıları başlatın ve karanlık ortamda oksijen alımı ölçümünü başlatın. Sıcaklığı, karıştırıcıyı ve kolorimetrik oksjen alımı kaydedicisini günlük olarak kontrol edin ve kapların içeriğindeki herhangi bir renk değişimine dikkat edin. Altı kap için oksijen alımını uygun bir metod ile örneğin BOD eğrisi veren altı-nokta çizelge kaydedicisinden doğrudan okuyun. Normal olarak 28 günlük İnkübasyon sonunda, kapların içeriğinin pH' ını ölçün ve test kimyasalı kalıntısının, herhangi bir ortamın ve suda çözünebilir madde varlığında DOC {Ek-II.4.} derişimini belirleyin. Uçucu kimyasallar varlığında özel dikkat gösterin. Eğer nitratlaşma umuluyorsa, mümkünse nitrat ve nitrit derişimini belirleyin.

VII.3 Veriler ve raporlama

VII.3.1 Sonuçların işlenmesi

Aynı zamandan sonra alınan kör aşı kontrolu için düzeltilmiş, test kimyasalı tarafından belirtilen zaman sonrasında alınan oksijen miktarı (mg) kullanılan test kimyasalının ağırlığına bölünür. Buradan, mg oksijen/mg test kimyasalı olarak ifade edilen BOD elde edilir. Bu:
BOD=(test kimyasalı tarafından alınan mg O_2 – blank tarafından alınan mg O_2)/kaptaki mg test kimyasalı = mg O_2/mg test kimyasalı.
Daha sonra buradan biyolojik bozunma yüzdesi elde edilir:
% biyobozunma = % ThOD = BOD (mg O_2/mg kimyasal) x 100 / ThOD (mg O_2/mg kimyasal)

Karışımlar için, basit bir bileşikte olduğu gibi, elementel analizden ThOD' yi hesaplayın. Nitratlaşmanın yokluğuna veya tamamlanmasına göre uygun ThOD ($ThOD_{NH4}$ veya $ThOD_{NO3}$) kullanın (Ek-II.2). Eğer her nekedar, nitratlaşma olmuş fakat tamamlanmamışsa, nitrit ve nitrat derişimindeki değişimden hesaplanan nitratlaşmada tüketilen oksijen için düzeltme yapın (Ek- V).

Özel kimyasaldaki azalmadan ana bozunma yüzdesini hesaplayın (Bakınız I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

Fiziko kimyasal uzaklaştırma ölçülürken 1 no'lu kaptaki test kimyasalında bir azalma varsa, bunu rapor edin ve kaptaki yüzde biyolojik bozunmayı hesaplamak için, 28 günün sonrasında, test kimyasalın derişimini (Sb) kullanın.
DOC belirlemesi yapıldığında (isteğe bağlı), en büyük yüzde biyolojik bozunmayı buradan hesaplayın:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) x\ 100\%$$

I.7.1 böülümü altında açıklandığı gibi: Fizikokimyasal uzaklaştırmayı ölçerken eğer 1 no' lu kaptaki DOC' ta bir azalma varsa yüzde biyolojik bozunmayı hesaplamak için kaptaki DOC derişimini kullanın.

Eklenen veri formuna tüm sonuçları kayıt edin.

VII.3.2 Sonuçların geçerliliği

Normal olarak aşının oksijen alımı 20-30 mg O_2/l' dir ve 28 gün içinde, 60 mg/litreden fazla olmamalıdır. 60 mg/l' den yüksek değerler verilerin ve deneysel tekniklerin kritik incelemesini gerektirir. pH değerleri 6-8,5 aralığının dışında ise ve test kimyasalının oksijen alımı %60' dan az ise, test kimyasalının daha düşük derişimleri ile test tekrarlanmalıdır.

Ayrıca bakınız I.5.2

Eğer, oksijen tüketiminden hesaplanan yüzde anilin bozunması 7 gün sonunda % 40' dan fazla olmazsa ve 14 gün sonunda % 65' den fazla olmazsa, test geçersiz olarak kabul edilir.

VII.3.3 Raporlama

Bakınız I.8

VII.4 Veri formu
Veri formunun bir örneği aşağıda verilmektedir.

MITI (I) TESTİ

1. LABORATUVAR
2. TESTİN BAŞLANGIÇ TARİHİ
3. TEST MADDESİ

İsim:
Stok çözelti konsantrayonu: kimyasal olarak mg/litre
Ortamdaki ilk konsantrasyon, C_0: kimyasal olarak mg/litre
Reaksiyon karışımının hacmi, V:ml

ThOD: mg O_2/l

4. AŞI

Çamur örneği alınan bölgeler:

1) ...
2) ...
3) ...
4) ...
5) ...
6) ...
7) ...
8) ...
9) ...
10) ...

Sentetik lağım suyu ile alıştırılmış iyonundan sonra aktif çamur içindeki asılı katıların derişimi = ... mg/l

Son ortamın litresi başına aktif çamurun hacmi = ...ml

Son ortamdaki çamur derişimi =...mg/l

5. OKSİJEN ALIMI: BİYOBOZUNABİLİRLİK

Kullanılan respirometre tipi

			Zaman (Günler)				
			0	7	14	21	28
test kimyasalı başına O_2 alımı (mg)	a_1						
	a_2						
	a_3						
Kör başına O_2 alımı (mg)	b						
Düzeltilmiş O_2 alımı (mg)	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
mg test kimyasalı başına BOD	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Kap 1					
		Kap 2					
		Kap 3					
% bozunma $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		ortalama *					

Not : Referans bileşikleri için benzer format kullanılabilir.

*Tekrarlar arasında kaydadeğer bir fark varsa ortalama almayın

6. KARBON ANALİZİ (isteğe bağlı):
   Karbon analiz cihazı:

Kap	DOC				Uzaklaştırılan % DOC	Ortalama
	Ölçülmüş		Düzeltilmiş			
Su + test maddesi	a				-	-
Çamur + test maddesi	b_1		b_1 - c			
Çamur + test maddesi	b_2		b_2 - c			
Çamur + test maddesi	b_3		b_3 - c			
Kontrol kör	c		-		-	-

$$\text{uzaklaştırılan \% DOC} : \frac{a-(b-c)}{a}$$

7. ÖZEL KİMYASAL ANALİTİK VERİLER

	Test sonundaki test kimyasalının artık miktarı	% Bozunma
Su ile körtesti	S_b	
Aşı ortamı	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\text{\% bozunma} = \frac{S_b - s_a}{S_b} \times 100$$

Sırasıyla, a1, a2 ve a3 kapları için % bozunmayı hesaplayın

8. AÇIKLAMALAR
   Zamana karşı BOD eğrisi, eğer mümkünse, eklenmelidir.

Ek - I

Kısaltmalar ve tanımlar

DO: Çözünmüş oksijen (mg/l), sulu çözeltiler içinde çözünmüş oksijenin derişimidir.

BOD: Biyokimyasal oksijen ihtiyacı (g) test maddesi metabolize olurken mikro-organzimalar tarafından tüketilen oksijen miktarıdır: g test bileşiği başına g oksijen olarakta ifade edilir. (Bakınız metod C.5).

COD: Kimyasal oksijen ihtiyacı (g) test bileşiğinin yükseltgenmesi esnasında sıcaklık ve asidik dikromat ile tüketilen oksijen miktarı; bu yükseltgenebilir miktarda bulunan madde miktarının ölçümünü sağlar; Test bileşiğinin gramı başına tükenen g oksijen olarakta ifade edilir.

DOC: Çözünmüş organik karbon (DOC) çözeltide bulunan veya 0,45 mikrometrelik filtreden geçen veya 40000 $m.s^{-2}$ (± 4000 g)' de 15 dakika santrifüjledikten sonra sıvı çözelti içinde kalan organik karbondur.

ThOD: Teorik oksijen ihtiyacı, kimyasalı tamamen yükseltgemek için gerekli toplam oksijen miktarıdır (mg); Molekül formülünden hesaplanabilir ve mg test bileşiği başına gerekli mg oksijen olarak da ifade edilebilir.

$ThCO_2$: Teorik karbon dioksit (mg) tamamen mineralize edildiğinde, test bileşiğinin bilinen veya ölçülen karbon kaynağından elde edilmiş olarak hesaplanan karbon dioksit miktarıdır.

TOC: Örneğin toplam organik karbonu çözeltideki ve süspansiyondaki organik karbonların toplamıdır.

IC: İnorganik karbon

TC: Toplam karbon, örnekte bulunan organik ve inorganik karbonun toplamıdır.
Birincil biyolojik bozunma:Biyolojik etkilerle, ortaya çıkan, maddenin özgün özelliğinin kaybolması ile sonuçlanan, kimyasalyapıdaki değişimdir.

En yüksek biyolojik bozunma (aerobik):Test maddesi tamamen mikro organizmalar tarafından kullanıldığında, karbon dioksit, su,mineral tuzları ve mikrobiyal hücresel bileşen (biyolojik kütle) üretimi ile sonuçlanan bozunma seviyesidir.

Kolay biyobozunabilir:En yüksek biyobozunabilirlik için belirli, tanımlanmış izleme testlerinden geçen, keyfi kimyasalsınıflandırması; aerobik şartlar altında, sulu ortamlarda hızlı ve tamamen bozunabilir bileşikler için bu testler oldukça zorludur.

Doğal biyobozunabilir:Kabul edilmiş biyobozunabilirlik testleri içinde, biyobozunurluk belirtisi olan (birincilveya en yüksek dereceden) kimyasallar için sınıflandırma.

Arıtılabilirlik:Normal arıtma işlemini olumsuz şekilde etkilemeden biyolojik atık su arıtma işlemi esnasında bileşiğin uzaklaştırmaya karşı uygunluğu. Genel olarak, kolay biyobozunur bileşikler arıtılabilirken, doğal biyobozunur bileşiklerin tümü arıtılamaz. Abiyotik işlemde de yürütülebilir.

Gecikme zamanı:die-away testindeki aşılamadan, bozunma yüzdesinin en az % 10 artırılmasına kadar geçen zamandır.

Bozunma zamanı:Gecikme zamanı sonundan, % 90 maksimum bozunma seviyesine ulaşılmasına kadar geçen zamandır.

10-gün süre:%10 bozunmanın elde edilmesinden hemen sonraki 10 gün

Ek - II

Uygun kısa parametrelerin hesaplanması ve belirlenmesi

Seçilen metoda bağlı olarak, belirli kısa parametrelere ihtiyaç duyulacaktır. Takip eden bölümde bu değerlerin türetilmesi açıklanacaktır. Bu parametrelerin kullanımının açıklaması kendileriyle ilgili metodlarda verilir.

1. Karbon içeriği

karbon içeriği, bilinen elementel bileşimden veya test maddesinin elementel analizi ile belirlenerek hesaplanır.

2. Teorik oksijen ihtiyacı (ThOD)

Teorik oksijen ihtiyacı (ThOD) elementel bileşim biliniyorsa hesaplanabilir veya elementel analiz ile elde edilebilir. Bileşik için:

$$C_cH_hN_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

nitratlaşma olmadan,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o}{MW} mg/mg$$

veya nitratlaşma ile,

$$ThOD_{NH3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o}{MW} mg/mg$$

3. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (COD)

Kimyasal oksijen ihtiyacı (COD), Test Yöntemi C.6.' ya göre belirlenir.

4. Çözünmüş Organik karbon (DOC)

0,45 mikrometrelik süzme işleminden geçen suyun içindeki herhangi bir kimyasalın karışımın organik karbonu olarak tanımlanan çözünmüş organik karbondur (DOC).

Uygun membran filtreler kullanarak, örnekler test kaplarından hemen çekilir ve süzülür. Süzüntünün ilk 20 ml' si (küçük süzgeçler kullanıldığı zaman miktar azaltılabilir) atılır. Eğer 10-20 ml ve daha küçük hacimler halinde enjekte edilenler varsa karbon analizi için alıkoyulur. Testte kullanılan ilk DOC derişiminin % 10' undan daha düşük ve eşdeğer karbon derişimini doğru olarak ölçme yeteneğine sahip organik karbon analiz cihazı vasıtasıyla DOC derişimi belirlenir.

Aynı çalışma gününde analiz edilemeyen süzülmüş örnekler 2-4 °C' de 48 saat veya uzun süreler için -18 °C altında buzdolabında depolanarak korunur.

Açıklamalar:

Hidrofilizasyon için membran süzgeçlerine sık sık yüzey aktif maddeler emdirilir. Böylece süzgeç, biyolojik bozunabilirlik belirlemesindeki ile girişim yapabilecek birkaç mg çözünebilir organik karbon içerebilir. Süzgeçler, her biri birer saatlik olan üç periyot halinde iyonu giderilmiş su içinde kaynatilarak, yüzey aktif maddeler ve diğer organik bileşikler giderilir. Daha sonra süzgeçler bir haftalığına su içinde depolanabilir. Eğer bertaraf edilebilir

süzgeçler kullanılıyorsa, çözünebilir organik karbon salmadıklarını doğrulamak için herbiri kontrol edilmelidir.

Membran süzgeçine bağlı olarak, tutunmayla test kimyasalı süzgeçte alıkonabilir. Buyüzden, bu olasılığa karşı test maddesinin süzgeç tarafından tutulmadığından emin olunması tavsiye edilir.

DOC' a karşı TOC' un ayırt edilmesi için süzme yerine, 15 dakika 40000 m.sec2 ' da santrifüjleme kullanılabilir. Hem tüm bakteriler uzaklaştırılmadıkça hemde bakteriyel plazmanın bir parçası olan karbon yeniden çözülmedikçe <10 mg DOC/l ilk derişimde metod güvenilir değildir.

KAYNAKLAR

-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. 46,139.
-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), 169.

Ek-III

Az çözünen maddelerin biyobozunabilirliklerinin değerlendirilmesi

Az çözünen maddelerin biyolojik bozunablirlik testlerinde, aşağıdaki durumlar için özel dikkat gereklidir.

Homojen sıvılarda nadir örnekleme problemleri görülür, homojen olmamadan kaynaklanan hatalardan kaçınmak için katı maddenin uygun miktarda homojenize edilmesi gereklidir. Yüksek miktarda safsızlık içeren kimyasal veya madde karışımlarını temsil eden birkaç miligram örnek alınması durumunda özel dikkat gösterilmelidir. Test esnasında çeşitli çalkalama türleri kullanılabilir. Kimyasalı dağılmış bir halde tutmak için aşırı ısınmadan, fazla köpükten ve aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır, yeterli derecede çalkalamanın kullanılmasına dikkat edilmelidir.

Kimyasalın kararlı dağıtılmasını sağlayan emülsiyon yapıcılar kullanılabilir. Emülsiyon yapıcı madde test şartları altında, bakterilere karşı zehirli olmamalı ve biyolojik olarak bozunmamalı veya köpüklenmeye sebep olmamalıdır.

Emülsiyon yapıcılarda olduğu gibi aynı kriterler çözücülere de uygulanır.

Katı taşıyıcıların, katı test maddeleri için kullanılması tavsiye edilmez, fakat sadece maddeler için uygun olabilir.

Emülsiyon yapıcı madde, çözücüler ve taşıyıcılar gibi yardımcı maddeler kullanıldığı zaman, yardımcı maddeyi içeren bir aşı uygulaması gerçekleştirilmelidir.

CO_2, BOD, MITI respirometrik testlerinden herhangibiri, az çözünen maddelerin biyolojik bozunabilirlik çalışmalarında kullanılablir.

KAYNAKLAR

-de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
-Gerike, P ., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Ek- IV

Aşıya karşı toksik olduğundan şüphelenilen kimyasalların biyobozunabilirliklerinin değerlendirilmesi

Bir kimyasal kolay biyonozunabilirlik testine maruz bırakıldığında ve biyolojik olarak bozunamaz olduğu ortaya çıktığında, yavaşlatma (inhibasyon) ve hareketsizlik (tepkimeye girme eğilimi) arasındaki fark isteniyorsa aşağıdaki işlem tavsiye edilir. (Reynolds et al., 1987).

Toksisite ve biyolojik bozunma testleri için benzer veya aynı aşı kullanılmalıdır.
Kolay biyolojik bozunabilirlik testlerinde çalışılan kimyasalın toksisitesini belirlemek için, çamur respirasyon hızı yavaşlatma (inhibasyon), (aktif çamur respirasyon yavaşlatma (inhibasyon) testi –Dir 87/302/EEC), BOD ve/veya büyüme yavaşlatma (inhibasyon) metodlarından uygun görülen bir tanesi veya bu metodların bir kombinasyonu uygulanabilir.

Eğer toksisiteden kaynaklanan bir yavaşlatmadan kaçınılmak isteniyorsa, kolay biyolojik bozunabilirlik testinde kullanılan madde derişiminin, toksisite testinden elde edilen EC_{50} değerlerinin 1/10' dan daha az olması önerilir. EC_{50} değeri 300 mg/l' den daha büyük olan bileşiklerin, kolay biyolojik bozunabilirlik testinde toksik etkiye sahip olma olasılığı yoktur.

20 mg/l' den daha düşük EC_{50} değerleri, sonradan gelen testler için problem yaratma eğilimindedir. Zorlayıcı ve duyarlı kapalı şişe testini veya ^{14}C ile etiketlenmiş madde kullanımını gerektiren testlerde düşük test derişimleri yer almalıdır. Alternatif olarak, şartlandırılmış (adapte edilmiş) aşı daha yüksek test maddesi derişimlerinin kullanımına izin verir. Ancak, daha sonraki durumlarda, kolay biyolojik bozunabilirlik testinin özgün ölçütleri kaybedilir.

KAYNAKLAR

Reynolds, L. et al. , Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

Ek-V

Nitratlaşmadan kaynaklanan girişimler için oksijen alımını düzeltme

N-içermeyen test maddelerinin biyolojik bozunabilirliğindeki oksijen alımının belirlenmesinde nitratlaşmayı dikkate almamadan kaynaklanan hatalar, test ve kör kapları arasında olduğu gibi test ortamında kararsızca amonyum-N'una yükseltgenmesi olsa bile, düşük seviyededir (% 5 den büyük değil). Fakat, N içeren test maddleri için ciddi hatalar ortaya çıkabilir.

Nitratlaşma oluyorsa fakat tamamlanmadıysa ve eğer nitrit ve nitrat inkübasyonu esnasındaki derişim değişimi, aşağıdaki denklemler dikkate alınarak belirlenirse, amonyumun nitrit ve nitrata yükseltgenmesinde kullanılan oksijen miktarı için reaksiyon karışımının gözlenen oksijen alımı düzeltilebilir.

$2NH_4Cl + 3O_2 = 2HNO_2 + 2HCl + 2H_2O$ (1)
$2\ HNO_2 + O_2 = 2HNO_3$ (2)

Toplam:

$2NH_4Cl + 4O_2 = 2\ HNO_3 + 2HCl + 2H_2O$ (3)

Denklem (1) den, amonyum klorür (NH_4Cl) içindeki 28 g azotun nitrite yükseltgenmesindeki oksijen alımı 96 gramdır, örneğin bir 3,43 (96/28) faktörü vardır. Aynı yolla, Denklem (3) de 28 g azot tarafından, nitrata yükseltgenmek için alınan oksijen miktarı 128 gramdır, örneğin 4,57 (128/28) faktörü vardır.

Reaksiyonların ardışık olması için, nitrit derişiminin artması ve azalması için mümkün olan ayrı ve farklı bakteriyel türler tarafından gerçekleştirilmiş olmalıdır; daha sonraki durumlarda nitratın eşdeğer derişimleri oluşturulmuş olabilir. Böylece, nitrit derişimindeki artışla çarpılan, nitrit oluşumu ile ortaya çıkan oksijen 3,43 veya derişimdeki azalma ile çarpılarak, kendi derişimindeki azalma ile oksijen kaybı -3,43 iken, nitrat derşimindeki artış ile çarpılan nitrat oluşumundaki oksijen 4,57 dir.

Bu:

Nitrat oluşumunda tüketilen O_2 = 4,57 x nitrat derişimindeki artış (4)

ve

Nitirit oluşumunda tüketilen O_2 = 3,43 x nitrit derişimindeki artış (5)

ve

Nitritin kaybolmasındaki O_2 kaybı = -3,43 x nitrat derişimindeki azalma (6)

Bu yüzden

Nitratlaşmadan kaynaklanan O_2 alımı = ±3,43 x nitrit derişimindeki değişme + 4,57 x nitrat derişimindeki artış (7)

ve böylece

C yükseltgenmesinden kaynaklanan O_2 alımı = nitratlaşmadan kaynaklan gözlenen toplam alım (8)

Alternatif olarak, yanlızca yükseltgenmiş N belirlenirse, nitratlaşmadan kaynaklanan oksijen alımı ilk yaklaşım olarak, 4,57 x yükseltgenmiş N' deki artış alınabilir.

Daha sonra C yükseltgenmesinden kaynaklanan oksijen tüketimi için düzeltilmiş değer, Ek-II' deki gibi hesaplanmış ThOD NH_3 ile karşılaştırılır.

C.5 BOZUNMA- BİYOKİMYASAL OKSİJEN İHTİYACI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntemin amacı katı veya sıvı organik maddelerdeki biyokimyasal oksijen ihtiyacını ölçmektir.

Bu test ile ayrıntılandırılan veriler suda çözünen bileşiklere aittir, ancak uçucu bileşikler ve suda az çözünen bileşikler de, test edilebilir.

Bu yöntem yalnızca, testte kullanılan derişimde bakterilere engelleyici (inhibitör) olarak etki etmeyen organik test malzemelerine uygulanabilir. Eğer test malzemesi, test derişiminde çözünebilir değilse ultrasonik dağıtma gibi özel önlemler uygulanarak test malzemesinin iyi bir şekilde dağılımı sağlanmalıdır.

Kimyasalın toksisitesi ile bilgi, düşük sonuçların yorumlanmasında ve uygun test derişiminin seçiminde yararlı olabilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Biyokimyasal oksijen ihtiyacı (BOD) belirlenen şartlarda, maddenin belirli hacminin biyokimyasal yükseltgenmesi için gereken çözünmüş oksijenin kütlesi olarak tanımlanır.

Sonuçlar test maddesinin gramı başına gereken gram BOD olarak ifade edilir.

1.3. Referans maddeler

Aşının etkinliğini kontrol edebilmek için uygun bir referans malzemesinin kullanımı gereklidir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Önceden belirlenmiş uygun ve iyi havalandırılmış bir ortamda çözünmüş veya dağıtılmış maddenin belirli bir miktarı mikroorganizmalarla aşılanır ve karanlıkta sabit oda sıcaklığında bekletilir.

BOD, testin başlangıcındaki ve sonundaki çözünmüş oksijen miktarları arasındaki fark ile belirlenir. Testin süresi en az beş gün olmalı 28 günden fazla olmamalıdır.

Kör test örneği içermeyen analiz örneği ile paralel olarak yürütülmelidir.

1.5. Kalite kriterleri

BOD'nin belirlenmesi maddenin biyolojik bozunmasının geçerli bir ölçütü olarak düşünülemez. Bu test yalnızca izleme yöntemi olarak değerlendirilmelidir.

1.6. Test yöntemlerinin tanımlanması

Maddenin bir ön çözeltisi yada dağılımı (dispersiyonu) kullanılan yöntemle uyumlu bir BOD derişiminin elde edilmesi için hazırlanır. Daha sonra BOD uygun bir ulusal yada uluslar arası standard yöntem kullanılarak belirlenir.

2. VERİLER VE DEĞERLENDİRME

Ön çözeltinin içerdiği BOD seçilen normalize edilmiş yönteme göre hesaplanır ve test maddesinin gramı başına gereken gram cinsinden BOD'ye çevrilir.

3. RAPORLAMA

Kullanılan yöntem belirtilecektir.

Biyokimyasal oksijen ihtiyacı en az 3 geçerli ölçümün ortalaması olmalıdır.

Sonuçların yorumlanmasına ilişkin bütün bilgiler ve notlar özellikle safsızlıklar, fiziksel hal, toksik etkiler ve sonuçları etkiyebilecek maddenin yapısı belirtilmelidir.

Biyolojik nitratlanmayı engellemek için katkı malzemesi kullanımı belirtilmelidir.

4. KAYNAKLAR

Standardlaştırılmış metodların listesi, örneğin:

NF T 90-103 : Biyolojik oksijen ihtiyacının belirlenmesi
NBN 407: Biyolojik oksijen ihtiyacı
NEN 32355 : Bepaling van het biochemich zuurstofverbruik
Biyolojik oksijen ihtiyacının belirlenmesi, su ve bağlantılı malzemelerin belirlenmesi, HMSO, Londra
TS 4957 EN 1899 :Su Kalitesi- n Günden Sonra Biyokimyasal Oksijen İhtiyacının Tayini (BOİn)

C.6 BOZUNMA- KİMYASAL OKSİJEN İHTİYACI

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntemin amacı katı veya sıvı organik maddelerdeki kimyasal oksijen ihtiyacının (COD) sabit laboratuvar koşullarında standard, rasgele bir şekilde, ölçümüdür.

Maddenin formülündeki bilgi bu testi yürütmek ve elde edilen sonuçları (örneğin: halojenli tuzlar, organik bileşiklerin ferrous -*yükseltgenme basamağı 2 olan demir*- tuzları, organoklorlu bileşikler) yorumlamak için faydalı olacaktır.

1.2. Tanım ve birimler

Kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) bir maddenin yükseltgenebilmesinin bir ölçüsü olan ve sabit laboratuvar şartlarında, madde tarafından tüketilen yükseltgen madde miktarı olarak açıklanır.

Sonuçlar test maddesinin gramı başına gereken COD olarak ifade edilir.

1.3. Referans maddeleri

Yeni bir maddeyi araştırırken herzaman referans maddesinin kullanımına gerek yoktur. Referans maddeler öncelikle, başka bir yöntem uygulandığı zaman elde edilen sonuçları kıyaslayabilmek ve yöntemi zaman zaman kalibre etmek için kullanılmalıdır.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Suda çözünmüş veya dağıtılmış maddenin önceden belirlenmiş bir miktarı potasyum dikromat ile gümüş sülfatın katalizör olarak kullanıldığı güçlü sülfürik asit ortamında geri soğutucu altında 2 saat yükseltgenir. Kalan dikromat demir (II) amonyum sülfat kullanılarak titre edilip belirlenir. Klor içeren maddelerde klor girişimini düşürmek için civa sülfat eklenir.

1.5. Kalite ölçütleri

Belirlemenin rasgele olması dolayısıyla, COD bir yükseltgenebilirlik belirtecidir ve organik maddenin belirlenmesinde pratik bir yöntem olarak kullanılır. Bu testte klor girişim yapabilir, ayrıca inorganik indirgen ve yükseltgen maddeler COD'nin belirlenmesinde girişim yapabilir. Bazı halkasal bileşikler ve pek çok uçucu maddeler (özellikle düşük karbon sayılı yağ asitleri) bu yöntemle bütünüyle yükseltgenmez.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

250 ve 600 mg/L arasında bir COD elde etmek için maddenin bir ön çözeltisi yada dispersiyonu hazırlanır.

Kullanımdan sonra, çevreye yayılmasını önlemek için civa tuzları içeren çözeltiler işleme tabi tutulur.

Az çözünen yada dağılamayan maddelerde, bir miktar iyice öğütülmüş katı madde yada yaklaşık 5 mg COD'ye karşılık gelecek şekilde sıvı madde tartılır ve suyla birlikte deneysel düzeneğe konulur.

Kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) sık sık ve özellikle az çözünen maddelerde yöntemin bir varyasyonu olan kapalı bir sistemdeki bir basınç eşitleyicisi (H.Kelkenberg, 1975) ile belirlenir. Asetik asit gibi geleneksel yöntemlerle zorlukla belirlenebilen değişime uğramış bileşikler genellikle başarılı şekilde bu yöntemle nicel olarak belirlenebilir. Yöntem piridin örneğindeki gibi bazen çalışmaz. Eğer referans 1'de belirtildiği gibi potasyum dikromat derişimi 0.25 N'ye(0,0416 M) yükseltilirse suda az çözünen maddelerin COD'sinin belirlenmesinde, 5–10 mg madde doğrudan kullanılır (2).

Aksi taktirde, COD uygun ulusal yada uluslararası standard yöntemler kullanılarak belirlenir.

2. VERİLER VE DEĞERLENDİRME

Deney cam balonununda bulunan COD seçilen normalize edilmiş yönteme göre hesaplanır ve test maddesinin gramı başına gereken gram cinsinden COD'ye çevrilir.

3. RAPORLAMA

Kullanılan yöntem belirtilecektir.

Kimyasal oksijen ihtiyacı en az 3 geçerli ölçümün ortalaması olmalıdır.

Sonuçların yorumlanmasına ilişkin bütün bilgiler ve notlar özellikle safsızlıklar, fiziksel hal, toksik etkileri ve sonuçları etkiyebilecek maddenin yapısından kaynaklanan özellikleri belirtilmelidir.

Klor derişimini en aza indirmek için kullanılan civa sülfatın kullanımı belirtilmelidir.

4. KAYNAKLAR

(1) Kelkenberg, H.Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.
(2) Gerike, P. Suda az çözünen bileşiklerin biyolojik bozunma testi. Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Standardlaştırılmış metodların listesi, örneğin:
NBN T 91–201: Kimyasal oksijen ihtiyacının belirlenmesi
ISBN O 11 7512494: Kirletilmiş ve atık suların kimyasal oksijen ihtiyacı
NF T 90–101: Kimyasal oksijen ihtiyacının belirlenmesi
DS 217: Su analizinde kimyasal oksijen ihtiyacının belirlenmesi
DIN 38409-H–41: 15 mg/L değerinin üzerinde kimyasal oksijen ihtiyacı belirlenmesi
NEN 3235 5,3 Bepaling van het biochemich zuurstofverbruik
TS 2789 ISO 6060 Su kalitesi: Kimyasal oksijen ihtiyacı dikromat metodları

C.7 BOZUNMA- pH'NIN FONKSİYONU OLARAK ABİYOTİK BOZUNMA HİDROLİZİ

1. YÖNTEM

Bu test yöntemi OECD TG 111 (2004) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Kimyasallar, yüzey sularına; doğrudan uygulama, spreyleme, sulama suları, drenaj, atık bertarafı, sanayi, evsel veya tarımsal sıvılar ve atmosferik salınım gibi yollarla girebilirler ve bu sularda kimyasal (örneğin hidroliz, oksidasyon), fotokimyasal ve/veya mikrobiyal süreçler ile dönüşüm geçirebilirler. Bu yöntem, çevrenin normal pH değerlerinde (pH 4'ten pH 9'a kadar) sucul sistemlerde kimyasalların abiyotik hidrolitik dönüşümlerini değerlendirmek için yöntemi tarif etmektedir ve mevcut test kılavuzlarına dayanır (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Deneyler, (i) bir maddenin hidroliz hızını pH'ın fonksiyonu olarak belirlemeyi ve (ii) organizmaların maruz kalacağı hidroliz ürünlerinin neler oldukları, doğaları ile oluşum ve yok olma hızlarını belirlemek için yürütülürler. Bu tür çalışmalar, suya doğrudan uygulanan veya yukarıda bahsedilen yollarla çevreye ulaşabilecek kimyasallar için talep edilmektedir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Ek-II'ye bakınız.

1.3. Yöntemin uygulanabilirliği

Yöntem, genelde, yeterli doğruluk ve hassasiyete sahip bir analitik yöntemin mevcut olduğu (işaretlenmemiş veya işaretlenmiş) kimyasal maddelere uygulanabilir. Suda yeterli çözünürlüğe sahip az uçucu ve uçucu olmayan bileşiklere uygulanabilir. Test, sudan yüksek seviyede uçucu olan ve bu nedenle testin deney koşullarında çözeltide kalamayan (fumigantlar, organik çözücüler gibi) kimyasallara uygulanmamalıdır. Suda çok az çözünen maddeler için bu testin uygulanması zor olabilir (8).

1.4. Test yönteminin ilkesi

Farklı pH'lara sahip steril tampon çözeltiler, test maddesi ile muamele edildikten sonra kontrollü laboratuvar koşullarında (sabit sıcaklıkta) karanlıkta inkübe edilirler. Uygun zaman aralıklarında, tampon çözeltilerdeki test maddesi ve hidroliz ürünleri analiz edilir. (^{14}C gibi) İşaretlenmiş bir test maddesi kullanıldıysa, kütle dengesi daha kolay kurulabilir.

Test yöntemi, Ek-I'de gösterildiği ve açıklandığı üzere aşamalı bir tasarıma sahiptir. Her aşama, bir önceki aşamanın sonuçlarına göre belirlenmektedir.

1.5. Test maddesi hakkında bilgi

Hidroliz hızını ölçmek için işaretlenmemiş veya işaretlenmiş bir test maddesi kullanılabilir. Hidroliz yolunu araştırmak ve kütle dengesini kurmak için işaretlenmiş malzeme genelde tercih edilmektedir. Diğer taraftan, özel durumlarda, mutlaka işaretlemeye gerek olmayabilir. 14C-işaretlemesi tavsiye edilir fakat 13C, 15N, 3H gibi izotoplar da kullanışlı olabilir.

Mümkün olduğunca molekülün en sabit kısmı (kısımları) işaretlenmelidir. Örneğin, test maddesi tek halka içeriyorsa, işaret bu halkaya yerleştirilmeli; iki veya daha fazla halka içeriyorsa da, her halkadaki sonucu değerlendirmek ve hidroliz ürünlerinin oluşumu hakkında uygun bilgi elde edebilmek için ayrı çalışmalar yapılması gerekebilir. Test maddesi en az %95 saflıkta olmalıdır.

Hidroliz testini yapmadan önce, test maddesi ile ilgili aşağıdaki bilgiler hazır olmalıdır:
(a) sudaki çözünürlük (Test Yöntemi A.6);
(b) organik çözücülerdeki çözünürlük;
(c) buhar basıncı (Test Yöntemi A.4) ve/veya Henry Yasası Sabiti;
(ç) n/oktanol/su dağılım katsayısı (Test Yöntemi A.8);
(d) ayrışma sabiti (pK_a) (OECD Rehberi 112) (9);
(e) uygunsa, sudaki doğrudan ve dolaylı fotodönüşüm hızı.

1.6. Referans maddeler

Hidroliz ürünlerinin kimliklerinin ve miktarlarının spektroskopik ve kromatografik yöntemler veya diğer uygun hassas yöntemlerle belirlenmesi için mümkün olan yerlerde referans maddeler kullanılmalıdır.

1.7. Kalite ölçütü

1.7.1. Geri kazanım

Tekrar tampon çözeltilerini veya bunların özütlerini, test maddesini ekledikten hemen sonra analiz etmek, analitik yöntemin tekrar edilebilirliği ve test maddesi için uygulama prosedürünün uygunluğu konusunda ilk işaretleri verir. Deneylerin ileri aşamalarındaki geri kazanım, bağıl kütle dengesi ile bulunur (işaretlenmiş malzeme kullanılırsa). İşaretlenmiş ve işaretlenmemiş kimyasallar için geri kazanım oranı %90 ile %110 arasında olmalıdır. Bu aralığa erişmek teknik açıdan zor oluyorsa, işaretlenmemiş kimyasallar için %70'lik geri kazanım oranı kabul edilir fakat gerekçesi raporlanmalıdır.

1.7.2. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti

Test maddesi ve sonra da hidroliz ürünlerinin miktarını bulmak için kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği, ölçüm için yeteri miktarda hidroliz ürünü oluştuktan sonra aynı tampon çözeltilerin (veya bunların özütlerinin) çift analizi ile kontrol edilebilir.

Analitik yöntem, başlangıç test maddesi konsantrasyonunun %10'u ve hatta daha azını ölçebilecek kadar hassas olmalıdır. İlgili olduğu yerlerde, analitik yöntemler, ayrıca, herhangi bir hidroliz ürününün miktarını, yani (çalışmanın herhangi bir zamanında) uygulanan miktarın %10'u veya daha fazlasından, zirve konsantrasyonun %25 veya daha azını, ölçebilecek kadar hassas olmalıdır.

1.7.3. Hidroliz kinetik verisi için güven aralıkları

Güven aralıkları tüm regresyon katsayıları, hız sabitleri, yarı ömürler ve diğer kinetik parametreleri (ör. DT50).

1.8. Test yönteminin tanımı

1.8.1. Ekipman ve düzenek

N-oktanol-su ayrışma katsayısı gibi önceden toplanan bilgiler test maddesinin cam üzerine yapışma özelliği olduğunu göstermiyorsa, çalışma cam kaplarda (ör. Test tüpleri, küçük şişeler), karanlık ve steril ortamda yürütülür. Aksi halde, (teflon gibi) alternatif malzemeler düşünülebilir. Test maddesinin cama yapışma problemini çözmek için aşağıdaki yöntemlerden biri veya birkaçı da kullanılabilir:

- Test tüpüne emirilen test maddesi ve hidroliz ürünlerinin kütlesi belirlenir,
- ultrasonik banyo kullanılır,
- her numune alımı arasında bütün cam parçalar çözücü ile yıkanır,
- formülasyon ürünler kullanılır,
- yardımcı çözücünün miktarı arttırılarak test maddesi sisteme eklenir; yardımcı çözücünün test maddesini hidroliz etmemesi gerekir.

Normal olarak, çalkalama işleminin kontrollü sıcaklık ayarı yapılabilen su banyosunda veya çeşitli test çözeltilerinin inkübasyon işlemlerinin termostatlı kontrol edilen inkübatörlerde gerçekleştirilmesi arzu edilir.

Standard laboratuvar ekipmanı ve özellikle aşağıdaki malzemeler gereklidir:
- pHmetre,
- GC, HPLC, TLC ekipmanı gibi analitik cihazlarla beraber, radyoişaretlenmiş ve işaretlenmemiş veya ters izotoplu seyreltme yöntemini analiz edebilecek uygun tespit sistemleri,
- tespit amaçları için cihazlar (ör. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, vs.)
- sıvı sintilasyon tezgahı,
- sıvı-sıvı özütleme için ayırma hunisi,
- çözeltileri ve özütleri yoğunlaştırmak için cihazlar (ör. dönen buharlaştırıcı)
- sıcaklık kontrol aracı (ör., su banyosu)

Aşağıdakileri de içeren kimyasal tepkenler:
- organik çözücüler, analitik derece, hekzan, diklorometan, vs.
- sintilasyon sıvısı,
- tampon çözeltiler (ayrıntılı bilgi için 1.8.3.bölüm'e bkz.)

Tüm cam malzemeler, tepken-derece su ve hidroliz testlerine kullanılan tampon çözeltiler sterilize edilir.

1.8.2. Test maddesinin uygulaması

Test maddesi, sulu çözelti halinde, farklı tampon çözeltilere uygulanır (Ek-III'e bakınız). Yeterli çözünme için, gerekirse, su ile karışabilen az miktarda çözücü kullanarak test maddesinin dağılımı sağlanır fakat bu normalde hacimce %1/1'i geçmemelidir. Daha yüksek konsantrasyonlarda çözücülerin kullanılması düşünülüyorsa, çözücünün test maddesinin hidrolizi üzerine hiçbir etkisi olmadığı gösterilmelidir.

Formülasyon ürünler genelde tavsiye edilmez çünkü formülasyon içeriğinde bulunan maddelerin hidroliz sürecini etkileme ihtimali bulunmaktadır. Fakat, suda çözünürlüğü çok

düşük olan test maddeleri veya cama yapışan test maddeleri için (1.8.1. bölüme bakınız) formülasyon malzemenin kullanımı uygun bir seçenek oluşturur.

Test maddesinin tek konsantrasyonu kullanılır; bu da 0,01M veya doygunluk konsantrasyonunun yarısını geçmemelidir (Ek-I'e bakınız.)

1.8.3. Tampon çözelti

Hidroliz testi ph4, ph7 ve ph9'da yürütülür. Bu amaçla, tampon çözeltiler tepken derece kimyasallar ve su kullanarak hazırlanır. Bazı uygun tampon sistemleri Ek-III'de verilmiştir. Kullanılan tampon sisteminin hidroliz hızını etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır ve bu tür bir durumla karşılaşılırsa farklı bir tampon sistemi kullanılmalıdır([1]).

Her tamponun pH'ı, uygun sıcaklıkta, kalibre edilmiş bir pH metre ile en az 0,1'lik bir kesinlikte kontrol edilir.

1.8.4. Test koşulları

1.8.4.1. Test sıcaklığı

Hidroliz deneyleri sabit sıcaklıklarda yürütülür. Dışdeğerbiçim için, sıcaklığı en az ± 0,5°C'de korumak önemlidir.

Test maddesinin hidrolitik davranışı bilinmiyorsa, 50 °C'de bir ön-test (Aşama 1) yapılır. Aşama 1 testinde, test maddesinin hidrolize dayanıklı olduğu tespit edilmemişse, en az üç sıcaklıkta (50 °C dâhil) sonraki aşama kinetik testleri yürütülür. Raporlama sıcaklığı olan 25 °C'yi ve alanda karşılaşılan çoğu sıcaklığı da içeren 10-70 °C aralığı tavsiye edilir (25 °C'nin altında en az bir sıcaklık denenir).

1.8.4.2. Işık ve oksijen

Bütün hidroliz testleri fotolitik etkilerden kaçınmak için uygun bir yöntem kullanılarak yürütülür. Oksijenden kaçınmak için bütün uygun önlemler alınır (ör. çözelti hazırlığından beş dakika önce helyum, nitrojen veya argon uçurulur).

1.8.4.3. Test süresi

Ön test beş gün yürütülür. Daha yüksek aşama testler ise test maddesinin %90'ı hidrolize oluncaya kadar veya 30 gün boyunca (hangisi önce gelirse) sürdürülür.

1.8.5. Test süresi

1.8.5.1. Ön test (Aşama 1)

Ön test 50 ± 0,5°C sıcaklıkta ve PH 4.0, 7.0 ve 9.0'da yürütülür. Eğer beş gün sonra %10'dan az hidroliz gözlendiyse ($t_{0,5\ 25}$ °C>1 yıl), test maddesi hidrolitik olarak kararlı kabul edilir ve normalde başka teste gerek kalmaz. Maddenin, çevresel sıcaklıklarda kararsız olduğu

([1]) Mabey ve Mill, fosfat tamponlar yerine borat ve asetat tamponların kullanılmasını tavsiye etmiştir (11).

biliniyorsa([1]), ön test gerekli değildir. Analitik yöntem yeteri kadar kesin ve başlangıç konsantrasyonunun %10'unu tespit edebilecek kadar hassas olmalıdır.

1.8.5.2. Kararsız maddelerin hidrolizi (Aşama 2)

İleri aşamalarda test, yukarıda bahsedilen ön testin sonucunda test maddesinin kararsız olduğu belirlenen pH değerlerinde yapılır. Test maddesinin tampon çözeltileri seçilen sıcaklıklarda termostatlanır. İlk derece davranışı test etmek için, her tepkime çözeltisi belirli zaman aralıklarında analiz edilir. Bu zaman aralıkları test maddesinin %10'u ila %90'ının hidrolizine denk gelecek şekilde ayarlanmış minumum altı veri noktası sağlamalıdır. En az altı numuneleme zamanında (en az 12 tekrar veri noktası için) her bir tekrar test örneği (ayrı tepkime kaplarında bulunan minimum sayıda tekrar testleri) çıkartılır ve içerikleri analiz edilir. Her numuneleme aralığında çıkartılan test çözeltisinin bireysel alikotlarının tek bir yığın numune olarak kullanılması yeterli değildir çünkü veri değişkenliğinin analiz edilmesine imkan vermez ve test çözeltisinin kirlenmesi sorununa yol açabilir. İleri aşama testlerin sonunda (yani %90 hidroliz gerçekleştiğinde veya 30. günde) testlerin steril olup olmadıkları kontrol edilir. Bozunma (yani değişim) gözlemlenmediyse, sterilite testleri gerekli değildir.

1.8.5.3. Hidroliz ürünlerinin tanımlanması (Aşama 3)

Uygulanan dozun en azından %10'unu temsil edebilecek miktarda önemli hidroliz ürünleri, uygun analitik yöntemler kullanılarak tespit edilir.

1.8.5.4. İsteğe bağlı testler

Hidrolitik olarak kararsız test maddeleri için pH 4, 7 ve 9 dışındaki başka pH değerlerinde yürütülecek diğer testlere ihtiyaç olabilir. Örneğin, fizyolojik açıdan daha asidik şartlarda (örneğin pH 1 veya 2'de) test yürütülerek, tek bir uygun fizyolojik sıcaklık (37 °C) sağlanabilir.

2. VERİ

Test maddesinin ve hidroliz ürünlerinin miktarları, ilk uygulamanın % değeri olarak ve uygun olduğu yerde her numune almada, pH değeri ve test sıcaklığı için mg/L olarak verilir. Buna ilaveten, işaretlenmiş madde kullanıldığı zamanlarda, uygulanan ilk konsantrasyonun yüzde değeri cinsinden kütle dengesi de verilir.

Test maddesi konsantrasyonlarının log-dönüşümü yapılmış test maddesi konsantrasyonlarının zaman karşı grafiği raporlanır. Uygulanan dozun en azından %10'unu temsil edebilecek miktarda olan bütün önemli hidroliz ürünleri tespit edilir ve bunları log-dönüşümü yapılmış konsantrasyonları, ana madde için yapılan şekilde grafiğe aktarılarak oluşma ve yok olma hızları gösterilir.

2.1. Sonuçların işlenmesi

Yarı-ömür veya DT_{50} değerlerinin daha doğru belirlenebilmesi için uygun kinetik modeli hesaplamalar kullanılır. Yarı-ömür ve/veya DT_{50} değerleri (güven aralıkları dâhil), her pH ve sıcaklık değeri için kinetik derecesi ve determinasyon katsayısı (r^2) hesaplamak için kullanılan

[1] Bu tür bilgi, yapısal olarak benze bileşiklerin hidroliz verilerine ilişkin literatür verilerinden veya daha önceki aşamalarda test maddesi ile yapılan ön, yarı-niceliksel hidroliz testlerinde bulunabilir.

modelin tarifi ile birlikte yazılır. Uygun olduğu yerde, hesaplamalar hidroliz ürünleri için de gerçekleştirilir.

Farklı sıcaklıklarda yürütülen hız çalışmaları durumunda, sözde ilk-derece hidroliz hız sabitleri (k_{obs}) sıcaklığın bir işlevi olarak tanımlanır. Hesaplama, hem katalize olan asit, nötr ve katalize olan baz hidrolizi için k_{obs}'un hız sabitlerine ayrışmasına, hem de Arrhenius denklemine dayanır:

$$k_{obs}=k_H[H^+]+k_{nötr}+k_{OH}[OH^-]=\sum_{i=H,nötr,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

Bu denklemde Ai kesişim regresyon sabiti, Bi eğimin regresyon sabiti olup, ln ki'yi Kelvin(T) cinsinden mutlak sıcaklığına karşı doğrusal regresyon uygulayarak oluşturulan en iyi uyan doğrulardan elde edilir. Asit, nötr ve baz ile katalize edilen hidroliz için Arrhenius ilişkilerinin kullanılması ile doğrudan deney yapılması mümkün olmayan sıcaklıklar sözde ilk-derece hız sabitleri, ve bundan da yarı-ömür belirlenebilir (10).

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Hidroliz tepkimelerinin çoğu ilk derece tepkime hızlarına uyar ve bu nedenle yarı-ömürler konsantrasyondan bağımsızdır (Ek-II'deki dördünce denkleme bakınız.). Bu, genelde 10-2 ila 10-3 M'da tespit edilen laboratuvar sonuçlarının çevresel koşullara (<= 10-6 M) uyarlanmasına olanak sağlar (10). Çeşitli kimyasallar için pH ve sıcaklık değerlerinin ikisinin de kaydedildiği durumlarda hem saf suda, hem doğal sularda ölçülen hidroliz hızları arasında iyi bir uyum olduğu Mabey ve Mill tarafından rapor edilmiştir (11).

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, en az aşağıdakileri içerir:

Test maddesi:
- genel adı, kimyasal adı, CAS numarası, yapısal formülü (radyoaktif olarak işaretlenmiş malzeme kullanıldığında, işaretin veya işaretlerin yerini göstererek) ve ilgili fizikokimyasal özellikler; (Bakınız Bölüm 1.5),
- test maddesinin saflığı (safsızlıklar);
- işaretlenmiş kimyasalın radyokimyasal saflığı ve molar aktivitesi (uygun olduğunda)
- Tampon çözeltiler:
- hazırlama tarih ve detayları,
- kullanılan su ve tamponlar,
- tampon çözeltilerin molaritesi ve pH'sı.

Test koşulları;
- çalışmanın yürütüldüğü tarihler,
- uygulanan test maddesinin miktarı,
- test maddesi için kullanılan çözücüler ve uygulanan yöntem,
- inkübasyon edilen tamponlanmış test maddesi çözeltilerinin hacmi,
- kullanılan inkübasyon sisteminin tarifi,
- çalışma esnasındaki pH ve sıcaklık,

- örnekleme zamanları,
- ekstraksiyon yöntemi veya yöntemleri,
- tampon çözeltilerdeki test maddesi ve test maddesinin hidroliz ürünlerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için yöntemler,
- tekrar sayıları.

Sonuçlar:
- kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti,
- geri kazanım oranları (geçerli bir çalışma için % değerler bölüm 1.7.1' de verilmiştir),
- tablo halinde tekrar ve ortalama verileri,
- çalışma esnasında ve sonundaki kütle dengesi;
- ön test sonuçları,
- sonuçların tartışılması ve yorumlanması,
- tüm orijinal veri ve rakamlar.

Hidroliz hızının tespit edildiği durumlarda, ilaveten, aşağıdaki bilgiler de gereklidir:
- test maddesi konsantrasyonun zamana karşı grafiği ve uygun olan yerlerde, hidroliz ürünlerinin her pH değeri ve sıcaklığa karşı grafikleri,
- 20 °C/25 °C sıcaklıkta Arrhenius denkleminin sonuçlarının bulunduğu tablo; tabloda pH, hız sabiti, yarı-ömür veya DT50, sıcaklıklar [° C] ile birlikte güven sınırları ve korelasyon katsayıları veya karşılaştırılabilir bilgi yer almalıdır,
- Önerilen hidroliz yolu.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD, (1981) Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency, (1982) 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 o 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) European Union (EU), (1995) Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides, (1991) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA, (1980) Merkblatt No 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC, (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD, (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.

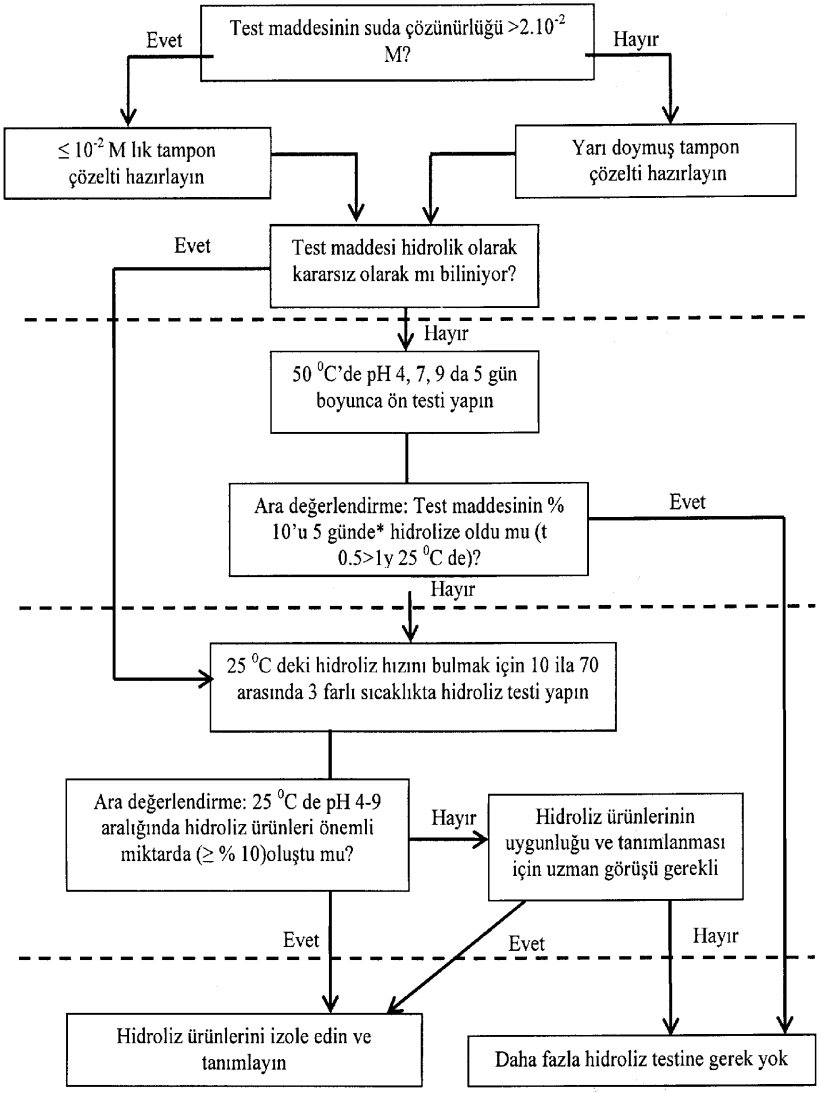
(9) OECD, (1993) Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P., (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T., (1978) Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, p. 383-415.

Ek-I

Aşamalı Hidroliz Test Şeması



* test maddesinin % 10'unun hidrolize olması 50 °C'de yaklaşık 30 gün 20 °C'de 1 yıl yarı ömre karşılık gelir.

Ek-II

Tanımlar ve birimler

Standard Uluslararası (SI) birimler kullanılır.

Test maddesi: ana bileşik veya ilgili dönüşüm ürünlerinden herhangi biri.

Dönüşüm ürünleri: test maddesinin biyotik ve abiyotik dönüşüm tepkimelerinden çıkan bütün maddeler.

Hidroliz ürünleri: test maddesinin hidrolitik dönüşüm tepkimelerinden çıkan tüm maddeler.

Hidroliz, bir test maddesi olan RX'in su ile tepkimesi ve sonucunda tepkime merkezinde X grubu ile OH grubunun net karşılıklı değişimini ifade eder:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Bu basitleştirilmiş süreçte, RX konsantrasyonunun azalma hızı, hız belirleme basamağına bağlı olarak aşağıdaki eşitliklerden biri ile verilir:

$hız = k\,[H_2O]\,[RX]$ ikinci dereceden tepkime

veya

$hız = k\,[RX]$ ilk dereceden tepkime

Test maddesine oranla su miktarının çok daha fazla olmasından dolayı, bu tür tepkime genelde sözde-ilk derece tepkime olarak tanımlanır ve gözlenen hız sabiti aşağıdaki eşitlikte yer alır

$$k_{obs} = k\,[H_2O] \qquad [2]$$

ve aşağıdaki denklemden bulunabilir (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

Burada t, zaman; C_0, C_t ise 0 ve t zamanlarında RX konsantrasyonudur.

Bu sabitin birimleri, $(zaman)^{-1}$ ve tepkimenin yarı-ömrü (RX'in %50'sinin tepkimesi için geçen zaman) boyutlarına sahip olup, aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Yarı-ömür: Tepkime ilk derece kinetik olarak tanımlandıysa, bir test maddesinin %50'sinin hidroliz olabilmesi için geçen zamanı ($t_{0,5}$) ifade eder; konsantrasyondan bağımsızdır.

DT_{50} (Kayboluş Zamanı 50): test maddesi konsantrasyonunun %50 azaldığı süredir; tepkime ilk derece kinetiğe uymuyorsa, yarı-ömür olan $t_{0,5}$'ten farklıdır.

Farklı sıcaklıkta k'nin hesaplanması

İki sıcaklık için hız sabiti biliniyorsa, diğer sıcaklardaki hız sabitleri Arrhenius denklemi kullanarak hesaplanabilir:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ veya } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

ln k'nın 1/T'ye ilişkisi, -E/R eğimli bir düz çizgi verir. Burada:

k = farklı sıcaklıklarda ölçülen hız sabiti,
E = aktivasyon enerjisi [kJ/mol],
T = mutlak sıcaklık [K],
R = gaz sabiti [8,314 J/mol.K]'dir.

Aktivasyon enerjisi, aşağıdaki denklemle veya regresyon analizi ile bulunur ($T_2 > T_1$):

$$E = R \times \frac{lnk_2 - lnk_1}{(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2})}$$

Ek-III

Tampon Sistemleri

A. CLARK VE LUBS

CLARK ve LUBS Tampon çözeltileri (*)

Bileşim	pH
20 °C'de 0,2 N HCl ve 0,2 N KCl	
100 ml'ye 47,5 ml. HCl + 25 ml. KCl	1,0
100 ml'ye 32,25 ml. HCl + 25 ml. KCl	1,2
100 ml'ye 20,75 ml. HCl + 25 ml. KCl	1,4
100 ml'ye 13,15 ml. HCl + 25 ml. KCl	1,6
100 ml'ye 8,3 ml. HCl + 25 ml. KCl	1,8
100 ml'ye 5,3 ml. HCl + 25 ml. KCl	2,0
100 ml'ye 3,35 ml. HCl + 25 ml. KCl	2,2
20 °C'de 0,1 M potasyum bifitalat +0,1 N HCl	
100 ml'ye 46,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	2,2
100 ml'ye 39,60 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	2,4
100 ml'ye 32,95 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	2,6
100 ml'ye 26,42 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	2,8
100 ml'ye 20,32 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	3,0
100 ml'ye 14,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	3,2
100 ml'ye 9,90 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	3,4
100 ml'ye 5,97 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	3,6
100 ml'ye 2,63 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. bifitalat	3,8
20 °C'de 0,1 M potasyum bifitalat +0,1 N NaOH	
100 ml'ye 0,40 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	4,0
100 ml'ye 3,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	4,2
100 ml'ye 7,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	4,4
100 ml'ye 12,15 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	4,6
100 ml'ye 17,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	4,8

* Bu tablolarda yazılan pH değerleri Sorensen'in standard denklemlerindeki potansiyel ölçümlerden hesaplanmıştır (1909). Gerçek pH değerleri tablodaki değerlerin 0,04 kat üzerindedir.

100 ml'ye 23,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	5,0
100 ml'ye 29,95 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	5,2
100 ml'ye 35,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	5,4
100 ml'ye 39,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	5,6
100 ml'ye 43,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	5,8
100 ml'ye 45,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. bifitalat	6,0

CLARK ve LUBS Tampon çözeltileri (devam)

20 °C'de 0,1 M monopotasyum fosfat +0,1 N NaOH	
100 ml'ye 5,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	6,0
100 ml'ye 8,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	6,2
100 ml'ye 12,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	6,4
100 ml'ye 17,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	6,6
100 ml'ye 23,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	6,8
100 ml'ye 29,63 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	7,0
100 ml'ye 35,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	7,2
100 ml'ye 39,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	7,4
100 ml'ye 42,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	7,6
100 ml'ye 45,20 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	7,8
100 ml'ye 46,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat	8,0
20 °C'de 0,1 M KCl +0,1 N NaOH	
100 ml'ye 2,61 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	7,8
100 ml'ye 3,97 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	8,0
100 ml'ye 5,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	8,2
100 ml'ye 8,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	8,4
100 ml'ye 12,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	8,6
100 ml'ye 16,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	8,8
100 ml'ye 21,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	9,0
100 ml'ye 26,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	9,2
100 ml'ye 32,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	9,4
100 ml'ye 36,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	9,6
100 ml'ye 40,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	9,8
100 ml'ye 43,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. borik asit	10,0

B. KOLTHOFF VE VLEESHOUWER

KOLTHOFF VE VLEESHOUWER sitrat tamponları

Bileşimi	pH
18 °C'de 0,1 M monopotasyum sitrat ve 0,1 N HCl (*)	
100 ml'ye 49,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml.	2,2
100 ml'ye 43,4 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. sitrat	2,4
100 ml'ye 36,8 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. sitrat	2,6
100 ml'ye 30,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. sitrat	2,8
100 ml'ye 23,6 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. sitrat	3,0
100 ml'ye 17,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. sitrat	3,2
100 ml'ye 10,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. sitrat	3,4
100 ml'ye 4,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. sitrat	3,6
18 °C'de 0,1 M monopotasyum sitrat ve 0,1 N NaOH (*)	
100 ml'ye 2,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	3,8
100 ml'ye 9,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	4,0
100 ml'ye 16,3 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	4,2
100 ml'ye 23,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	4,4
100 ml'ye 31,5 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	4,6
100 ml'ye 39,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	4,8
100 ml'ye 46,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	5,0
100 ml'ye 54,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	5,2
100 ml'ye 61,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	5,4
100 ml'ye 68,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	5,6
100 ml'ye 74,4 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	5,8
100 ml'ye 81,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitrat	6,0

* Küf oluşumunu önlemek için thymol veya benzeri bir madde eklenir.

C. SÖRENSEN

SÖRENSEN'in borat karışımları

Bileşim		Sörensen	Walbum, pH		
ml. Boraks	ml. HCL/NaOH	18 °C	10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraks + 0,1 N HCL					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M boraks + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	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

SÖRENSEN'in fosfat karışımları

Bileşim	pH
20 °C'de 0,0667 M Monopotasyum fosfat + 0,0667 M Disodyum fosfat	
99,2 ml. KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml. KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml. KH_2PO_4+ 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml. KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml. KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml. KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml. KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml. KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml. KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6
53,4 ml. KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml. KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml. KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml. KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml. KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml. KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml. KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

C.8 TOPRAK SOLUCANLARININ TOKSİSİTESİ YAPAY TOPRAK TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu laboratuvar testinde test maddesi, solucanların 14 gün boyunca yerleştirildiği yapay bir toprağa eklenir. Bu süre sonunda (tercihen 7 gün sonra) maddenin toprak solucanları üzerine ölümcül etkisi araştırılır. Bu test kimyasalların toprak solucanları üzerine deriden ve beslenme yoluyla görece kısa dönemli ölümcül etkilerinin izlenmesini sağlar.

1.2. Tanımlar ve birimler

LC_{50} = Test süresince test hayvanlarının %50'sini öldüren madde derişimi

1.3. Referans maddeler

Test sisteminin hassasiyetinin kayda değer olarak değişmediğini göstermek için periyodik olarak bir referans maddesi kullanılır.

Analitik saflıkta kloroasetamid referans maddesi olarak önerilir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Toprak değişken bir ortamdır bu yüzden bu testte dikkatlice tanımlanmış yapay verimli toprak kullanılır. *Eisena foetida* türünün (bkz EK-I) yetişkin türleri farklı derişimlerde test maddesi ile muamele edilmiş yapay toprakta saklanır. Kapların (konteyner) içeriği bir tabla içine testin başlangıcından sonra 14 gün yayılır (yada isteğe bağlı 7 gün) ve her bir derişimde hayatta kalan toprak solucanları sayılır.

1.5. Kalite kriterleri

Test, test katmanı (substrat) ve organizmaya göre mümkün olduğu kadar tekrarlanabilir olacak şekilde tasarlanmıştır. Kontrol grubundaki ölüm oranı %10'u geçmemelidir; aksi takdirde test geçersizdir.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Malzemeler

1.6.2. Test katmanı (substratı)

Tanımlanmış yapay toprak temel test substratı olarak kullanılır.

(a) Temel substrat (yüzdeler kuru ağırlık cinsinden)
-10% Spahgnum yosunu turbası (pH 5,5 'ten 6,0'a mümkün olduğu kadar yakın ve gözle görünür bitki kalıntısı kalmamış ve iyi öğütülmüş)
-Tercihen %50'den fazla kaolinit içeren %20 kaolinit kili

-Yaklaşık %69 endüstriyel kuartz kumu (taneciklerinin %50'sinin büyüklüğü 0,05 ve 0,2 mm olan ince kumca zengin). Eğer madde suda yeterince dağıtılamıyorsa, test kabı başına 10 g madde test maddesiyle sonra karıştırılmak üzere hazır olmalıdır.

-pH'ı 6,0 ± 0,5'e ayarlamak için kimyasal saflıkta ve toz halinde yaklaşık %1 kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) eklenir.

(b) Test katmanı (substratı)

Test substratı, temel substrat, test maddesi ve deiyonize su içerir. Temel substratın su içeriği kuru ağırlığın %25 ila %42'si arasındadır. Substratın su içeriği 105 °C sıcaklıkta örnek sabit ağırlığa gelene kadar ısıtılarak belirlenir. Burada anahtar ölçüt yapay toprağı üzerine su çıkmayacak noktaya kadar ıslatılmasıdır. Test maddesinin substrat üzerine düzgün dağıtılması ve iyi bir karışım sağlanmasına dikkat edilmelidir. Test maddesi substrat üzerine hangi yolla dağıtıldığı belirtilmelidir.

(c) Kontrol substratı

Kontrol substratı, temel substrat ve su içerir. Eğer katkı bir ajan kullanılırsa, ilave bir kontrol aynı miktar katkı ajanı içermelidir.
1.1.1.1 Test kapları
1 litre kapasiteli (plastik kapak, saat camı yada havalandırma boşluklu plastik filmle sıkıca kapatılmış) substratın 500 gram kuru ağırlığına eşdeğer ıslak, test yada kontrol substratı ile doldurulmuş cam kaplar.

1.6.3. Test koşulları

Test kapları sürekli ışık alan, 20 ± 2 °C sıcaklıktaki iklimlendirilmiş bölmelerde tutulmalıdır. Işık şiddeti 400-800 lux olmalıdır.

Test süresi 14 gündür ama isteğe bağlı olarak ölüm oranı testin başlangıcından 7 gün sonra değerlendirilebilir.

1.6.4. Test işlemi

Test derişimleri

Test maddesinin derişimleri maddenin ağırlığının temel substratın kuru ağırlığına oranı (mg/kg) olarak ifade edilir.

Aralık bulma testi

Kesin testte kullanmak üzere derişimlerin aralığı hakkında bilgi edinmek için %0'dan %100 ölüme yol açan derişimlerin aralığı aralık bulma testi ile belirlenebilir.

Test maddesi şu derişimlerde test edilmelidir:
1000; 100; 10; 1; 0,1 mg madde/kg test substratı (kuru ağırlık)

Kesin bir test yürütülecekse, aralık bulma testi için 10 solucan içeren derişim başına bir test serisi ve bir seri işleme tabi tutulmuş kontrol yeterli olabilir.

Kesin test

Aralık bulma testinin sonuçları %0 - %100 aralığını kapsayan ve farkları 1,8'i aşmayan sabit faktör ile değişen geometrik serideki en az 5 derişimi bulmak için kullanılır.

Bu serideki derişimleri kullanan testler LC_{50} değerine ve bu değerin güven aralığının mümkün olduğu kadar kesin belirlenmesine izin vermelidir.
Kesin testte her birisi 10 solucan içeren her derişim için en azından 4 test serisi ve 4 muamele edilmemiş kontrol serisi kullanılır. Tekrar serilerinin sonuçları ortalama ve standard sapma olarak verilir.
1,8 oranındaki 2 ardışık derişim %0 ve %100 ölüm oranı verdiğinde, bu iki derişim LC_{50} 'nin düştüğü derişim aralığını belirtmede yeterlidir.

Temel test substratı ve temel test maddesi karışımı

Test substratı mümkün olan her durumda su dışında başka katkı maddeleri eklenmeden hazırlanmalıdır. Testin başlangıcından hemen önce test maddesinin deiyonize sudaki yada başka bir çözücüdeki emülsiyon yada dispersiyonu temel test substratı ile karıştırılır yada kromatografik yada benzer bir dağıtıcı ile düzgün bir şekilde dağıtılır.
Eğer suda çözünmezse, uygun bir çözücünün (örn. hekzan, aseton, kloroform) çok az bir hacminde çözünür.
Test maddesini çözmek, emülsiyon yada süspansiyon haline getirmek için yalnızca kolay uçabilen ajanlar kullanılır. Test substratı kullanım öncesi havalandırılmalıdır. Buharlaşan su miktarı tekrar eklenmelidir. Kontrol grubu aynı miktarda katkı maddesi içermelidir.

Test maddesi organik çözücülerde çözünür değil ve dispersiyon yada emülsiyonu da hazırlanamıyorsa 10 g ince kuartz kum ve 500 gram kuru ağırlıkta yapay toprağı muamele etmeye yetecek test maddesi test substratının 490 g kuru ağırlığı ile karıştırılır.

Her bir test serisi için, 500 g kuru ağırlığa eşdeğer miktarda ıslak test substratı, 24 saat ıslak temel substrata benzer substratta şartlandırılmış olan ve 10 toprak solucanı her bir cam kaba konulur, hızlıca yıkanır, fazla su süzgeç kağıdı ile absorbe edilir ve test substratının yüzeyine konulur.

Kaplar substratın kurumasını engellemek için delikli plastik tıpalar, saat camı yada film ile kapatılır ve 14 gün boyunca test şartlarında tutulur.

Değerlendirmeler test kurulduktan 14 gün (isteğe bağlı 7 gün) sonra yapılmalıdır. Test substratı camdan ya da paslanmaz çelikten yapılmış bir tabağa yayılır. Toprak solucanları incelenir ve canlı kalan toprak solucanlarının sayısı belirlenir. Toprak solucanları ön uçlarına uygulanan hafif mekanik bir uyartıya cevap vermiyorlarsa ölü kabul edilirler.
İnceleme 7 gün yürütüldükten sonra, kap substratla yeniden doldurulur ve canlı kalan toprak solucanları aynı test substratı yüzeyine yeniden konulur.

1.6.5. Test organizmaları

Test organizmaları yetişkin, kuru ağırlığı 300 ila 600 mg olan *Eisenia foetida* (ekteki nota bakınız) (slitellumla en az 2 aylık) olmalıdır (Yetiştirme metodu için eke bakınız).

2. VERİLER

2.1. Sonuçların işlenmesi ve değerlendirilmesi

Test edilen maddenin konsantrasyonları ölü toprak solucanlarının yüzdesine ilişkin olarak rapor edilir.

Veriler uygun ise LC_{50} değeri ve güven aralığı (p=0,05) standard yöntem kullanılarak belirlenmelidir (Litchfield and Wilcoxon, 1949, eşdeğer metod için). LC_{50} test substratının (yaş ağırlık) kilogram başına düşen mg cinsinden test maddesi olarak verilmelidir.

Derişim eğrisinin eğimi LC_{50} değerinin hesaplanmasına olanak vermeyecek kadar çok dik olduğu durumlarda bu değerin grafikten tahmin edilmesi yeterlidir.

1,8 oranındaki 2 ardışık derişim sadece %0 ve %100 ölüm oranı verdiğinde, bu iki derişim LC_{50} 'nin düştüğü derişim aralığını belirtmede yeterlidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

- test raporu, eğer mümkünse, aşağıdakileri içermelidir.
- testin yukarıda belirtilen kalite ölçütlerine uygun yürütüldüğünün açıklaması
- yürütülen test (aralık bulma testi ve/veya kesin test)
- test koşullarının ayrıntılı açıklaması yada testin metotla uyumlu olduğunun açıklaması (Sapmalar varsa belirtilmelidir.)
- test organizmaları hakkında bilgi (tür, yaş, ortalama ve ağırlık aralığı, saklama ve yetiştirme koşulları, tedarik edici)
- test maddesinin, temel test substratı ile nasıl karıştırıldığının ayrıntılı açıklaması.
- LC50 'nin belirlenmesinde kullanılan yöntem
- kullanılan bütün verileri içeren test sonuçları
- test organizmalarında gözlenen belirtiler (semptomlar) ve değişimlerin açıklaması
- LC50 yada ölüm oluşturmayan en yüksek test derişimi ve test başlatıldıktan 14 gün (isteğe bağlı 7 gün) içinde %100 ölüm oluşturan en düşük test derişimi
- konsantrasyon-cevap eğrisinin çizilmesi
- referans maddeleri ile elde edilen ve mevcut test ile ilgili yada önceki kalite kontrol denemeleri ile uyumlu olan test sonuçları

4. KAYNAKLAR

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.

(2) Edwards, C. A. and lofty,]. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, 331 pp.

(3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Commission of the European Communities, Development of a 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.

Ek-I

Testten Önce Toprak Solucanlarının Saklanması ve Yetiştirilmesi

Hayvanların yetiştirilmesi için 30 ila 50 toprak solucanı taze substrat ile besleme kabına konulur ve 14 gün sonra çıkarılır. Bu hayvanlar daha ilerideki yetiştirme serilerinde kullanılabilir. Toprak solucanları kozalarından çıkarılır ve olgunlaştıklarında test için kullanılırlar (Önceden belirlenmiş şartlarda 2 ve 3 ay sonra).

Saklama ve Yetiştirme koşulları

İklim bölmesi : Sıcaklık 20 ± 2 °C ve tercihen 400 ila 800 lux ışık şiddetinde sürekli ışıkta
Yetiştirme kutuları: Uygun derin olmayan 10 ila 20 L hacminde

Substrat: *Eisenia foetida* çeşitli hayvan dışkılarında yetiştirilebilirler. %50 turba ve %50 inek yada at gübresinde oluşan Yetiştirme ortamının kullanımı önerilir. Ortamın pH değeri yaklaşık 6-7 (kalsiyum karbonat ile ayarlanmış) ve düşük iyonik iletkenlikte(6 mmhos'tan az veya %0.5 tuz derişiminde). Substrat nemli olmalı fakat fazla ıslak olmamalıdır. Ayrıca, diğer başarılı yöntemlerde kullanılabilir.

Not: *Eisenia foetida* bazı taksonomların türlere ayırdığı 2 ırktan oluşur. Bu türler morfolojik olarak benzerdir ancak birisi *Eisenia foetida foetida* segmentleri üzerinde tipik çaprazlama çizgilere sahiptir diğerinde *Eisenia foetida andrei* bunlar yoktur ve bu değişik tonlarda kırmızımsı renktedir. Mümkünse *Eisenia foetida andrei* kullanılmalıdır. Diğer türler gerekli olan metodoloji mevcutsa kullanılabilir.

C.9 BİYOLOJİK BOZUNMA
ZAHN-WELLENS TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntemin amacı statik bir testte yüksek derişimde mikroorganizmalara maruz kaldığında suda çözünür uçucu olmayan organik maddelerin potansiyel nihai biyolojik bozunurluklarını hesaplamaktır.

Askıda katılara fizikokimyasal adsorpsiyon gerçekleşebilir ve bu sonuçların yorumlanmasında dikkate alınmalıdır.(Bakınız 3.2)

Çalışılan maddeler 50 ila 400 mg/litre DOC (Çözünmüş organik karbon)değer aralığında ya da 100 ila 1000 mg/litre COD (Çözünmüş oksijen ihtiyacı) değer aralığında derişiminde kullanılır. Bu görece yüksek derişimler analitik güvenilirliğe sahiptir. Toksik özellikteki bileşikler bozunma sürecini geciktirebilir yada tamamıyla durdurabilir.
Bu yöntemde, çözünmüş organik karbondaki derişimin ölçüsü yada kimyasal oksijen ihtiyacı test maddesinin nihai biyolojik bozunurluğunu belirlemek için kullanılabilir.

Özgün bir analitik yöntemin eş zamanlı kullanımı maddenin birincil biyolojik bozunurluğunun belirlenmesini sağlayabilir (Ana kimyasal yapının yok olması ile).

Bu yöntem, testte kullanılan derişimde:

- test koşullarında suda çözünebilir olan,
- test şartlarında buhar basıncı ihmal edilebilen
- bakterilere inhibitör olmayan
- test sistemi tarafından yalnızca sınırlı miktarda adsorbe edilebilen
- test çözeltisinden köpürmeyle yok olmayan organik maddelere uygulanabilirdir.

Elde edilen sonuçların yorumlanmasında test maddesindeki temel bileşenlerinin bağıl oranlarının özellikle sonuçların düşük yada marjinal olduğu hallerde bilinmesi yararlı olabilir. Uygun test koşullarının seçilmesinde ve düşük sonuçların yorumlanmasında maddenin mikroorganizmalara karşı olan toksisitesi hakkında bilgi gereklidir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Testin sonunda elde edilen bozunma "Zahn-Wellens testindeki biyolojik bozunurluk" olarak rapor edilir. Bu değer aşağıdaki eşitlik ile verilir:

$$D_t = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] x100$$

burada:

D_T= T anında % biyolojik bozunma
C_A=Testin başlangıcından 3 saat sonra karışımda ölçülen DOC (yada COD) değeri (mg/L)
C_T= Örnekleme anında test karışımındaki DOC yada COD değeri (mg/L)

C_B= Kör numunenin örnekleme anındaki DOC yada COD değeri (mg/L)
C_{BA}= Testin başlangıcından 3 saat sonra kör çözeltide ölçülen DOC (yada COD) değeri (mg/L)

Bozunmanın derecesi en yakın yüzde değere yuvarlanır.

Bozunmanın yüzde derecesi test edilen maddenin DOC (yada COD) olarak uzaklaştırılma yüzdesi belirtilir.

Maddenin 3 saat sonra ölçülen değeri ve hesaplanan yada tercihen ölçülen ilk değeri arasındaki fark maddenin yok edilmesi hakkında faydalı bilgi sağlayabilir (Bkz 3.2 sonuçların yorumlanması)

1.3. Referans maddeler

Yeni bir madde araştırılırken, referans maddelerinin kullanımı yararlı olabilir ancak henüz özgün bir referans maddesi önerilemeyebilir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Aktif çamur, mineral besinler ve sulu bir çözeltideki kaynaktaki başlıca karbon kaynağı olarak test maddesi, karıştırıcı ve havalandırıcı üniteleri bulunan 1 ila 4 litrelik bir cam kaba birlikte konulur. Karışım 20 ila 25 C sıcaklıkta, çok az ışıkla aydınlanan bir ortamda yada karanlık bir odada 28 gün boyunca havalandırılır ve karıştırılır. Bozunma süreci süzülmüş çözeltide günlük yada başka uygun zaman aralıklarında DOC yada COD değerleri belirlenerek izlenir. Her bir zaman aralığındaki giderilen DOC'nin (yada COD) başlangıçtan üç saat sonraki değere oranı yüzde biyolojik bozunma olarak ifade edilir ve bu değer o andaki bozunma miktarı olarak değerlendirilir.Bu sonuç zamana karşı biyolojik bozunurluk eğrisi oluşturmak için grafiğe geçirilir.

Özgül bir analitik yöntem kullanıldığında, ana molekülün derişiminde biyolojik bozunurluğa bağlı olan azalma ölçülebilir (birincil biyolojik bozunurluk).

1.5. Kalite kriterleri

Bu testin tekrarlanabilirliği, halka testinde tatminkâr olduğu kanıtlanmıştır.

Testin duyarlılığı çoğunlukla kör çözeltinin değişkenliğine bağlıdır ve az oranda da sıvıdaki test maddesi seviyesine ve çözünmüş organik maddenin tayininin doğruluğuna bağlıdır.
1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Hazırlıklar

1.6.1.1. Reaktifler (tepkenler)

Test suyu: Organik karbon içeriği <5 mg/litre olan içme suyudur. Kalsiyum ve magnezyum iyonlarının toplam miktarı 2.7 mmol/litreyi geçmemelidir aksi durumda deiyonize su yada damıtık suyla uygun bir seyreltme gereklidir.
Sülfürik asit, analitik saflıkta (A.R.): 50 g/l.
Sodyum hidroksit çözeltisi A.R.: 40 g/l.

Mineral besin çözelitisi: 1 L deiyonize suda çözünür.
Amonyum klorür, NH_4Cl, A.R.: 38,5 g,
sodyum dihidrojenfosfat, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A.R.: 33,4 g,
potasyum dihidrojenfosfat, KH_2PO_4, A.R.: 8,5 g,
di-potasyum mono-hidrojenfosfat, K_2HPO_4,A.R.: 21,75 g.

Karışım hem tampon hem de besin sistemi olarak görev alır.

1.6.1.2. Düzenek

1 ile 4 litre hacimde cam kaplar (silindirik kaplar).

Cam yada metal karıştırıcının uygun bir şaft üzerinde döndüğü karıştırıcı (karıştırıcı kabın tabanından 5 ila 10 cm yüksekte dönmelidir.) 7 ila 10 cm uzunluğunda bir manyetik karıştırıcı da kullanılabilir.

Hava vermek için 2 ila 4 mm iç çapında cam tüp. Tüpün ağzı kabın tabanından 1 cm yüksekte olmalıdır.

Santrifüj (3550 *g*)

pH-metre

Çözünmüş oksijen ölçer

Süzgeç veya filtre kağıtları

Membran süzme düzeneği

Gözenek büyüklüğü 0,45 mikron olan membran süzgeçler. Membran süzgeçleri süzme aşamasında ne karbonu salacak ne de maddeyi adsorplayacak şekilde olmalıdır.

Organik karbon içeriğini ve kimyasal oksijen ihtiyacını belirlemek için uygun analitik cihazlar.

1.6.1.3. Aşının hazırlanması

Biyolojik işleme tesisinden alınan aktif çamur santrifüjlenerek yada test suyuyla çöktürerek yıkanır.(tekrar tekrar)
Aktif çamur uygun bir koşulda olmalıdır. Bu tür bir çamur düzgün çalışan bir atıksu arıtma tesisinden alınabilir. Mümkün olduğu kadar değişik tür ve ırkta bakteri elde etmek için, değişik kaynaklardan aşıları karıştırmak tercih edilebilir (örneğin değişik arıtma tesisleri, toprak ekstraktları, nehir suları). Bu karışım yukarıda anlatıldığı şekilde muamele edilir.

Aktif çamurun aktivitesini kontrol etmek için aşağıda açıklanan fonksiyonel kontrol kısmına bakınız.

1.6.1.4. Test çözeltilerinin hazırlanması

Test kabına 500 ml test suyu, 2.5 mg/L mineral besin çözeltisi ve son karışımda 0,2 ila 1,0 g/L kuru maddeye karşılık gelecek aktif çamur eklenir. Son karışımda DOC derişimi 50 ila 400 mg/litre olacak şekilde maddenin stok çözeltisi eklenir. Karşılık gelen COD değerleri 100 ila 1000 mg/litredir. Test suyunun hacmi 1 ila 4 litreye tamamlanır. Toplam hacim miktarı alınan DOC ve COD belirlenmesindeki örnek sayısına ve analitik işlem için gerekli olan hacme göre seçilir.

Normal olarak 2 litre yeterlidir. En azında bir kontrol kabı (kör)test serileri ile paralel olacak şekilde yürütülür. Bu kontrol kabı sadece aktif çamur, test suyuyla hazırlanan besin minerali çözeltisi içerir ve toplam hacmi testtekilerin toplam hacmi ile aynıdır.

1.6.2. Testin performansı

Test kapları manyetik bir karıştırıcı ile veya pervaneli karıştırıcılarla çok az ışıkta yada karanlık bir odada 20 ila 25 °C sıcaklıkta karıştırılır. Havalandırma pamuk yünü filtresi ile temizlenen sıkıştırılmış hava ile ve gerektiğinde yıkama şişesi ile sağlanır. Çamurun çökmemesine ve oksijen derişiminin 2 mg/litrenin altına düşmemesine dikkat edilmelidir.

pH değeri belli aralıklarla kontrol edilmelidir ve gerektiğinde pH 7 ile 8 aralığında ayarlanmalıdır.

Her bir örnekleme öncesi buharlaşma dolayısıyla olan kayıplar gerekli miktarlarda deiyonize yada damıtık su eklenerek telafi edilir.

Bunun için iyi bir yol teste başlamadan önce kaptaki sıvı seviyesini işaretlemektir. Her bir örnekleme zamanında yeni işaretler konulur (havalandırmalı karıştırma olmadan) ilk örnekler test maddesinin aktif çamur tarafından adsorpsiyonunu belirlemek için her zaman testin başlangıcından 3 saat sonra alınır.

Test maddesinin giderimi günlük yada diğer düzenli bir zaman aralığında DOC veya COD'nin belirlenmesi ile izlenir. Test kabından ve kör çözeltiden alınan örnekler yıkanmış bir süzgeç kâğıdından dikkatlice süzülür. Süzülmüş çözeltinin ilk 5ml'lik kısmı atılır. Süzülmesi zor olan çamurlar önce 10 dak. santrifüj edilerek uzaklaştırılabilir. DOC ve COD tespiti en azında iki örnekle yapılır. Test 28 gün sürdürülür.

Not: Bulanık kalan örnekler membran süzgeçler ile süzülür. Membran süzgeçleri organik madde salmamalı veya adsorplamamalıdır.

Aktif çamurun fonksiyonel kontrolü

Bilinen bir madde içeren bir kap, aktif çamurun fonsiyonel kapasitesini kontrol etmek için test serileri ile paralel bir şekilde yürütülür. Dietilen glikol bu amaç için uygun bulunmuştur.

Adaptasyon (Alışma)

Eğer analizler görece düşük aralıklarda yürütülüyorsa, adaptasyon bozunma eğrisinden tanımlanabilir. Bu yüzden test hafta sonundan önce hemen başlatılmamalıdır.

Eğer periyodun sonunda adaptasyon gerçekleşiyorsa, test bozunmanın tamamlandığı süreye kadar uzatılabilir.

Not:
Eğer adapte olmuş çamurun davranışı hakkında daha geniş bilgi, gerekiyorsa, aynı aktif çamur aşağıdaki işleme göre aynı maddeye maruz bırakılır:

Karıştırıcı ve havalandırıcıkapatılır ve aktif çamur çöktürülür. Üst sıvı alınır 2 litre test suyuyla doldurulur. 15 dakika karıştırılır ve tekrar çöktürülür. Üst sıvı tekrar alındığında, geri kalan çamur aynı maddeyle 1.6.1.4 ve 1.6.2'ye göre test edilmek üzere tekrar kullanılır. Aktif çamur çöktürme yerine santrifüj ile de izole edilebilir.

Adapte olmuş çamur 0.2 ila 1 g kuru ağırlık/ litre derişimdeki taze çamurla karıştırılabilir.

Analitik araçlar;
Normal olarak örnekler ıslak süzgeç kağıdından dikkatlice süzülür (yıkama için deiyonize su kullanılır)

Bulanık kalan örnekler 0,45 mikronluk süzgeç kağıtlarından süzülür. Örnek süzüntülerinde DOC derişimi 2 örnekle TOC (Toplam Organik Karbon)cihazı kullanılarak gerçekleştirilir (ilk 5 ml atılır). Eğer süzüntü aynı gün analiz edilemiyorsa, ertesi gün analiz edilmek üzere buzdolabında saklanmalıdır. Daha uzun saklama önerilmez.

Örnek süzüntülerindeki COD derişimi COD analitik düzeneği ile referans (2) deki işleme göre belirlenir.

2. VERİLER VE DEĞERLENDİRME

DOC ve/veya COD derişimleri yukarıdaki 1.6.2 yöntemina göre en az iki örnekle belirlenir. T anında bozunma 1.2 'de verilen formüllere (tanımlar ile) göre hesaplanır. Bozunmanın derecesi en yakın yüzde değere yuvarlanır.

Testin sonunda elde edilen bozunma "Zahn-Wellens testindeki biyolojik bozunurluk" olarak rapor edilir

Not: Eğer testin tamamlanmasından önce bütünüyle bozunma gerçekleşmişse ve bu sonuç ertesi gün gerçekleştirilen başka bir test ile doğrulanabiliyorsa test sonuçlandırılabilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, eğer mümkünse, aşağıdakileri içermelidir.

- maddenin başlangıç derişimi

- test maddesi ile ilgili tüm deneysel sonuçlar ve diğer bilgiler, referans madde ve kör çözelti kullanılıp kullanılmadığı
- 3 saat sonraki derişim
- açıklaması ile birlikte biyolojik bozunma eğrisi
- test organizmalarının alındığı yer ve zaman ve adaptasyon durumu, kullanılan derişim
- test işlemlerindeki değişikliğe ilişkin her tür bilimsel sebep.

3.2. Sonuçların yorumlanması

COD veya DOC uzaklaştırması günler ve haftalar boyunca aşamalı olarak gerçekleşiyorsa bu test maddesinin bozunduğunun belirtisidir.
Ancak fizikokimyasal adsorpsiyon bazen rol oynayabilir.Bu etki başlangıçtan ilk 3 saat içinde bütünüyle yada kısmen bir uzaklaştırma varsa yada kontrol ve test üst sıvısı arasındaki fark beklenmeyecek şekilde düşük seviyede kalıyorsa anlaşılabilir.

Biyolojik bozunma (yada kısmi biyolojik bozunma) ile adsorpsiyon arasında ayırt edicilik varsa ileri testler yürütülmelidir.
Bu pek çok yolla yapılabilir fakat en ikna edici olanı üst sıvının esas ayarlı testte (tercihen respirometik test) aşı olarak kullanılmasıdır.

Bu testte yüksek, adsorptif olmayan DOC(COD) değerleri veren test maddeleri potansiyel olarak biyolojik bozunur kabul edilebilir.
Kısmi, adsorptif olmayan uzaklaştırma kimyasalın en azından biraz biyolojik bozunmaya maruz kaldığını gösterir. Düşük yada sıfır DOC (yada COD) uzaklaştırma değerleri test mikroorganizmaların test maddesi tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanabilir ve bu çamurun azalması ve parçalanmasıyla bulanık üst sıvı vermesi ile anlaşılabilir. Böyle durumlarda, test maddesinin daha düşük konsantrasyonları kullanılarak test tekrar edilmelidir.

Bileşiğe özgü bir analitik yöntemin kullanımı yada ^{14}C işaretli test maddesi kullanımı daha büyük bir hassasiyet sağlayabilir.
^{14}C işaretli bileşikte, $^{14}CO_2$ geri kazanımı biyolojik bozunmanın gerçekleştiğini doğrular.
Sonuçlar birincil biyolojik bozunma cinsinden verildiğinde, eğer mümkünse ana test maddesinin tepki kaybına yol açan kimyasal yapı değişikliğine ilişkin bir açıklama verilmelidir.

Yöntemin analitik geçerliliği, kör test ortamında bulunan test sonucu ile birlikte verilmelidir.

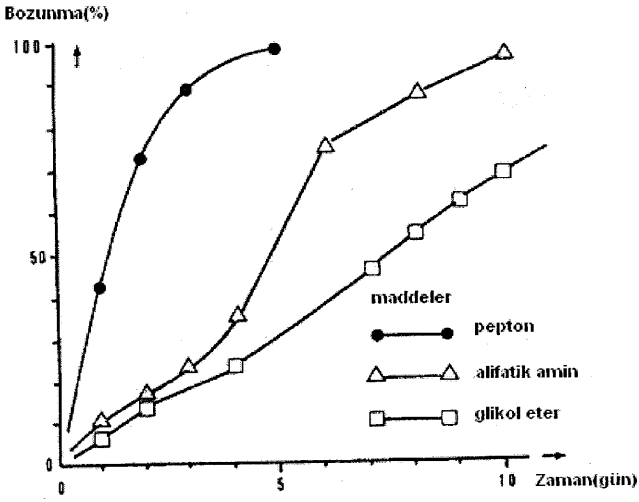
4. KAYNAKLAR

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.
(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, Official Journal of the European Communities, No L 251,19.9.1984.

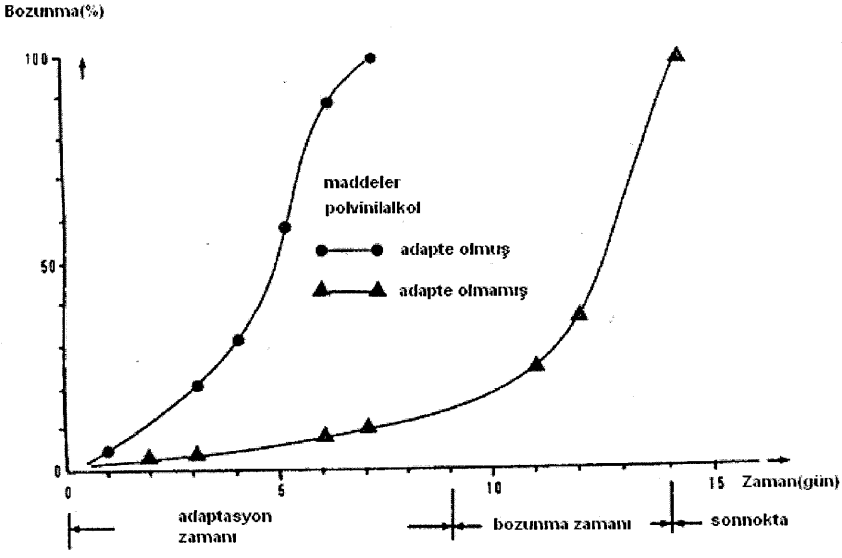
Ek-I

Organik bileşik:	4-Etoksibenzoik asit
Teorik test derişimi:	600 mg/L
Teorik DOC:	390 mg/l
Aşı	atıksu arıtma tesisi
Derişim:	1 gram kuru madde/litre
Adaptasyon durumu:	adapte olmamış
Analiz:	DOC-tayini
Örnek miktarı:	3 ml
Kontrol maddesi:	Dietileneglikol
Bileşiğin toksisitesi:	1000 mg/l altında toksik etkisi yok
Kullanılan Test:	Fermentasyon tüp testi

Test süresi	Kontrol maddesi						
	Şahit DOC (mg/L)	DOC* (mg/L)	DOC* net (mg/L)	Bozunma (%)	DOC*(mg/L)	DOC net (mg/L)	Bozunma (%)
0	-	-	300	-	-	390	-
3 saat	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 gün	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 gün	4,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 gün	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 gün	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 gün	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 gün	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 gün	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 gün	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99



Şekil 1
Biyolojik bozunma eğrisi örnekleri



Şekil 2
Çamur adaptasyon örnekleri

C.10 BİYOLOJİK BOZUNMA
AKTİF ÇAMUR BENZETİM (SİMÜLASYON) TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

1.1.1. Genel açıklamalar

Bu test

- test çözücülerinin hazırlanması için gerekli oranda suda çözünebilir olan,
- test şartlarında buhar basıncı ihmal edilebilen
- bakterilere inhibitör etki göstermeyen

organik maddelerde uygulanabilirdir.

Elde edilen sonuçların yorumlanmasında test maddesindeki temel bileşenlerinin bağıl oranlarının özellikle sonuçların düşük yada marjinal olduğu hallerde bilinmesi yararlı olabilir. Uygun test koşullarının seçilmesinde ve düşük sonuçların yorumlanmasında maddenin mikroorganizmalara karşı olan toksisitesi hakkında bilgi gereklidir.

1.1.2. En yüksek biyobozunurluluğun tayini

Bu yöntemin amacı maddenin aktif çamur tesis modelinde 12 mg DOC/litre'den fazla (yada yaklaşık 40mg COD/litre) derişime karşılık gelen; 20mg DOC/litre en uygun değerdir; herhangi bir metabolitin uzaklaştırılması ile nihai biyobozunurluluğun belirlenmesidir (DOC= Çözünmüş organik karbon; COD= kimyasal oksijen ihtiyacı).

Maddenin organik karbon içeriği (yada kimyasal oksijen ihtiyacı) belirlenmelidir.

1.1.3. Birincil biyolojik bozunurluluğun tayini (Özgül Analiz)

Bu yöntemin amacı maddenin aktif çamur tesis modelinde 20 mg DOC/litre derişimde özgün bir analitik yöntem uygulanarak birincil biyolojik bozunurluluğun belirlenmesidir (Toksisite ve analitik yöntem izin verirse, daha düşük veya daha yüksek derişimlerde kullanılabilir). Bu, maddenin birincil biyolojik bozunurluluğunun değerlendirilmesine imkan verir (Ana kimyasal yapının kaybolması ile).
Bu test yönteminun amacı, test edilecek olan maddenin mineralizasyonunu belirlemek değildir.

Test edilen madde için elverişli bir analitik yöntem mevcut olmalıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

1.2.1. DOC/COD analizi

Maddenin uzaklaştırılma derecesi:

$$DR = \frac{T-(E-E_o)}{T} x100\%$$

[(1a)]

eşitliği ile verilir.

burada:

DR= Test maddesine göre ortalama alıkonulma zamanında yüzde DOC(yada COD) uzaklaştırma derecesi

T= Test Maddesinin giriş konsantrasyonu, mg DOC/litre cinsinde (veya mg COD/litre cinsinde)

E= Test ünitesinin çıkış konsantrasyonu; mg DOC /litre olarak (yada COD)

E_0= Kör ünitesinin çıkış konsantrasyonu; mg DOC / litre(veya mg COD / litre cinsinden)

Bozunma, test maddesinin verilen alıkonma zamanında yüzde DOC (yada COD) uzaklaştırması olarak belirtilir.

1.2.2. Özgül analiz

Ortalama alıkonulma zamanı içerisinde maddenin sulu fazdan (R_w) yüzde giderimi:

$$R_W = \frac{C_I - C_o}{C_I} x100\%$$

[(1b)]

eşitliği ile verilir.

Burada:

C = Test ünitesi girişindeki madde konsantrasyonu (mg madde /litre, özgül analiz ile belirlenmiş)
C_0 = Test ünitesi çıkışındaki madde konsantrasyonu (mg madde / litre, özgül analiz ile belirlenmiş)

1.3. Referans maddeler

Yeni bir madde araştırılırken referans maddelerinin kullanımı yararlı olabilir ancak henüz özgül bir referans maddesi önerilemeyebilir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

En yüksek biyolojik bozunurluğun belirlenebilmesi için iki aktif çamur pilot ünitesi (OECD doğrulama testi yada gözenekli kap ünitesi) paralel olarak çalıştırılır. Test maddeleri bu birimlerin birisinin giriş akışına (sentetik yada evsel atıksu) ilave edilir ve diğeri yalnızca sadece atıksuyu alır. Özgül analiz ile giriş ve çıkış akışında birincil biyolojik bozunurluğun belirlenmesi için sadece tek bir ünite kullanılır.

DOC (yada COD) değişimleri çıkış akışlarında belirlenir yada madde derişimi özgül analiz ile belirlenir.

Test maddesine bağlı DOC ölçülmez yalnızca belirtilir.
DOC (yada COD) ölçümleri yürütüldüğünde, test ve kontrol çıkış akışlarındaki ortalama derişimler arasındaki farkın bozunmayan test maddesinden kaynaklandığı kabul edilir.

Özgül analizler yürütüldüğünde ana molekülün derişimindeki (konsantrasyonundaki) değişim ölçülebilir(Birincil biyolojik bozunma)
Üniteler ters aşılama prosedürüyle "eşlenmiş üniteler modunda" çalıştırılabilir.

1.5. Kalite kriterleri

Maddenin başlangıç derişimi kullanılan analiz ve onun sınırlamalarına bağlıdır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Hazırlık

1.6.1.1. Düzenek

Özgül analizlerin yürütülmesi dışında aynı tipte ünitelerden bir çift gereklidir. İki tip aygıt kullanılabilir:

OECD doğrulama testi

Ekipman (EK-I) sentetik atıksu saklamak için bir saklama kabı (A), doz ayar pompası (B), havalandırma kabı (C), ayırıcı (D), aktif çamuru geri-besleme yapmak için hava emici pompası (E) ve arıtılmış çıkış akısını toplamak için saklama kabı (F)'i içermektedir.
(A) ve (F) kapları 24 litre muhafaza edebilecek hacimde ve camdan yada plastikten yapılmış olmalıdır. (B) pompası sentetik atıksuyu, havalandırma kabına sabit akış sağlayacak şeklide olmalıdır ve bunun için giriş akımını ve derişimi istenilecek şekilde ayarlayacak herhangi bir sistem kullanılabilir. Normal çalıştırmada ayırıcının (D) yüksekliği, havalandırma kabının hacmi, karışım sıvısının hacminin 3 litresi olacak şekilde sabit tutulur.
Kalıplanmış havalandırma küpü (G) kap içinde koninin tepesinde askıda olacak şekilde tutulur. Havalandırıcıdan verilen havanın miktarı uygun bir akış-metre ile izlenebilir.

Hava pompası ayırıcıdan gelen aktif çamur sürekli ve düzenli bir şekilde havalandırma kabına geri besleyecek şekilde ayarlanır.

"Delikli kap"

Delikli kap konik kaideye 45 °açı yapan 14 cm çapında silindirik yapıdadır ve delikli polietilen tabakalarından oluşmuştur (2 mm kalınlıkta; maksimum gözenek büyüklüğü 95 mikron)

Delikli kap kabın silindirik bölgedeki yüksekliği 17.2 cm olan ve hacmini (3 L) olarak belirleyen 15 cm çapında su geçirmeyen uygun bir plastik içinde yer alır. İç kabın tepesinin etrafında uygun bir plastikten yapılı destekleyici bir halka vardır ve bu iç ve dış kaplar arasında 0.5 cm çıkış boşluğu sağlar.

Delikli kaplar ısısal kontrollü su banyosunun üzerine monte edilebilir. İç kabın tabanında uygun yayıcıların üzerine yerleştirildiği bir hava takviyesi vardır.
(A) ve (E) kapları 24 litre muhafaza edebilecek hacimde ve camdan yada plastikten yapılı olmalıdır. (B) pompası sentetik kanalizasyonu havalandırma kabına sabit akış sağlayacak şeklide olmalıdır ve bunun için giriş akışını ve derişimi istenilecek şekilde tutacak herhangi bir sistem kullanılabilir.

Kullanım sırasında tıkananları değiştirmek için yedek delikli kaplar gereklidir. Tıkanan kaplar çeşme suyuyla yıkandıktan sonra 24 saat hipoklorit çözeltisi içinde bekletilerek temizlenir.

1.6.1.2. Süzme

Gözenek büyüklüğü 0.45 mikron olan membran filtreleri ve membran filtrasyon cihazı.
Membran filtreleri, süzme aşamasında ne karbonu salacak ne de maddeyi adsorplayacakşekilde olmalıdır.

1.6.1.3. Atıksu

Sentetik besleme yada evsel atıksudan herhangi birisi kullanılabilir.

Sentetik besleme örneği hazırlamak için
Pepton: 160 mg,
Et özütü: 10 mg,
Üre: 30 mg,
NaCl: 7 mg,
$CaCl_2 .2H_2O$: 4 mg,
$MgSO_4 .7H_2O$: 2 mg
K_2HPO_4: 28 mg

alınır ve 1 L hacimdeki musluk suyu içinde çözülür.

Evsel atıksu:

Çoğunlukla evsel atıksu; arıtma tesisindeki birincil çökeltme tankından günlük taze olarak toplanmalıdır.

1.6.1.4. Test malzemesinin stok çözeltisi

Test çözeltisinin stok çözeltisi, örneğin %1'lik, test ünitesine eklenmek için hazırlanmalıdır. Atıksuya eklenecek yada istenilen test derişimini verecek şekilde ikinci bir pompa aracılığı ile doğrudan üniteye verilecek hacmin belirlenmesi için malzemenin derişimi belirlenmelidir.

1.6.1.5. Aşı

Açıklama: Evsel atıksu kullanıldığı zaman, düşük bakteriyel derişimde kullanılacak bir aşı noktası olmaz, ancak aktif çamur kullanılabilir.

Değişik aşılar kullanılabilir.

Uygun aşılara 3 örnek verilmiştir:

(a) ikincil çıkış akışından aşı
Aşı temel olarak evsel atıksu arıtma tesisinden toplanan iyi kalitede ikincil çıkış akışından elde edilmelidir. Çıkış akışı örnekleme ve kullanım periyotları arasında aerobik ortamda saklanmalıdır. Aşıyı hazırlamak için, örnek kaba bir süzgeçden geçirilir ve ilk 200 ml atılır. Süzülen kısım kullanıma kadar aerobik(oksijenli) ortamda saklanır. Aşı toplanma gününde kullanılmalıdır. Aşılama için en azıdan 3 ml kullanılmalıdır.

(b) Kompozit aşı
İkincil çıkış akısından elde edilen aşı:

Yukarıdaki açıklamalara bakınız.

Topraktan elde edilen aşı:
100 g bahçe toprağı (gübreli ama steril değil) 1000 ml kloru giderilmiş içme suyu içerisine asılı bırakılır (çok fazla kil, kum yada humus içeren topraklar uygun değildir.) Karıştırıldıktan sonra, süspansiyon çökmesi için 30 dak. bekletilir. Üst sıvı (süpernatant) kaba süzgeç kağıdı ile süzülür ve ilk 200 ml atılır. Süzülen kısım hemen ve kullanıma kadar havalandırılır. Aşı toplanma gününde kullanılmalıdır.

Yüzey suyundan elde edilen aşı:
İlave aşı kısmı, mezosaprobik yüzey suyundan hazırlanır. Örnek kaba bir süzgeç kağıdından süzülür ve ilk 200 ml atılır. Süzülen kısım aerobik (oksijenli) ortamda saklanır. Aşı toplanma gününde kullanılmalıdır.

3 ilave aşı kısmı örneği birleştirilir, iyice karıştırılır ve son aşı bu karışımdan alınır. Aşılama için en azıdan 3 ml kullanılmalıdır.

(c) aktif çamurdan elde edilen aşı
3 litreden fazla olmayan aktif çamur (askıda katı madde (AKM miktarı 2.5 g/L olan) ve ağırlıklı olarak evsel.atıksu arıtan tesisin havalandırma tankından alınır ve aşı olarak kullanılabilir.

1.6.2. İşlem

Bu test 18 ila 25 °C arasında sabit tutulan oda sıcaklığında gerçekleştirilir.

Eğer uygunsa, test 10 °C'ye kadar olan daha düşük bir sıcaklıkta da gerçekleştirilebilir. Eğer madde bozunuyorsa normal olarak başka bir işlem yapılmaz. Eğer madde bozunmuyorsa test 18 ila 25 °C arasındaki sabit bir sıcaklıkta yürütülmelidir.

1.6.2.1. Alıştırma periyodu: Çamur oluşturma ve ünitelerin dengelenmesi (stabilizasyonu)

Çamur büyümesi ve dengeleme periyodu kullanıla alıştırma koşullarında ünitelerin performansının ve aktif çamur içinde asılı olan katıların derişiminin sabitlendiği periyottur.

Alıştırma periyodu ise maddenin ilk eklendiği zamandan uzaklaştırılmasının bağıl sabit bir plato değerine ulaşmasına kadar geçen zamandır. Bu periyot altı haftayı geçmemelidir.

Değerlendirme periyodu test maddesinin sabit değere ve genellikle yüksek bir değere ulaştığı üç haftalık bir periyottur. İlk altı haftada çok az bozunan yada hiç bozunma göstermeyen maddeler için, değerlendirme periyodu aşağıdaki üç hafta olarak alınır.

Başlangıçta, ünite(ler) test için gerekli olan giriş sıvısı (influent) karıştırılan aşı ile doldurulur. Havalandırıcı (ve OECD doğruluma test ünitelerinde hava emici) ve doz ayarlama aygıtı çalışır duruma ayarlanır.

Madde içermeyen test edilecek giriş sıvısı (influent) saatte bir litre yada saatte 1,5 litre akış hızıyla havalandırma kabından (c) geçirilir ve bu akış hızı 3 ila 6 saatlik ortalama alıkonulma zamanına karşılık gelir.
Kabın içindeki süspansiyon sabit ve çözünmüş oksijen içeriği an az 2 mg/L olacak şekilde havalandırma hızı ayarlanır.

Köpürme uygun yollardan engellenmelidir. Köpük oluşumunu engelleyen ajanlar aktif çamuru inhibe ediyorsa kullanılmamalıdır.

Havalandırma kabının (C) tepesinde (ve OECD doğrulama test üniteleri kullanılıyorsa çöktürme birimimin tabanında (D) ve devri-daim devresinde) biriken çamur günde en az bir kere olacak şekilde fırçalayarak yada başka bir uygun yolla ana sıvıya geri döndürülmelidir.
Eğer çamur çökmüyorsa, %5 'lik demir (III) klorür çözeltileri ile özkütlesi artırılabilir ve bu işlem gerektiğinde tekrarlanır.

Çıkış sıvısı (effluent) 20 ila 24 saat süre ile kapta toplanır (E yada F) ve örnek iyice karıştırıldıktan sonra alınır. Tank dikkatlice temizlenmelidir (E yada F).

Sürecin verimliliğini kontrol etmek ve izlemek için, birikmiş çıkış sıvısının filtre edilmiş kesiminin ve filtre edilmiş giriş sıvısının (influent) kimyasal oksijen ihtiyacı yada çözünmüş organik karbon (DOC) miktarı en az haftada 2 kere ölçülür (gözenek büyüklüğü 0.45 mikron olacak membranlar kullanılır ve ilk 20 ml atılır).

Düzenli bir günlük bozunma değeri elde edildiğinde COD ve DOC değerlerindeki azalma yatay bir değer alır.

Havalandırma kabındaki aktif çamurun kuru madde içeriği haftada iki kere belirlenmelidir (g/L olarak). Bu üniteler iki yoldan biriyle çalıştırılabilir:

-aktif çamurdaki kuru madde içeriği haftada iki kere belirlenir ve eğer bu değer 2,5 g/Litre değerinden fazla ise fazla aktif çamur atılmalıdır, veya,
- ana sıvının 500 ml'si ortalama çamur alıkonulma zamanı 6 gün olacak şekilde her bir kaptan günlük olarak atılır.

İki ünitenin ölçülen ve hesaplanan parametreleri [süreç etkinliği (COD ve DOC uzaklaştırılması olarak), çamur derişim, çamur çöktürülebilirliği, çıkış sıvılarının bulanıklığı gibi] yeterince sabit olduğu zaman, test maddesi iki birimden birinin giriş sıvısına (influent) 1.6.2.2'de açıklandığı şekliyle eklenir.

Alternatif olarak, özellikle çamur aşı olarak ilave edildiğinde, test maddesi çamur büyüme periyodunun başlangıcında da eklenebilir.

1.6.2.2. Test işlemi

Alıştırma periyodundaki çalıştırma koşulları korunur. Test malzemesinin stok çözeltisinin (yaklaşık %1'lik) yeterli bir miktarı test biriminin giriş sıvısına eklenir ve böylelikle atıksudaki test maddesinin istenen derişimi elde edilir (yaklaşık 10 ila 20 mg DOC/litre yada 40 mg COD/litre).

Bu işlem stok çözelti ile atıksuyu uygun ve ayrı bir pompalama sitemi ile günlük olarak karıştırılarak gerçekleştirilebilir. Bu derişime aşama aşama ulaşılabilir. Eğer test maddesinin aktif çamur üzerine toksik bir etkisi yoksa daha yüksek değişimlerde denenebilir.

Kör ünite hiç madde eklemeden yalnızca giriş sıvısı (influent) ile beslenir. Çıkış sıvılarının (effluent) yeterli hacimleri analiz için alınır ve bir membrandan filtre edilir(0,45 mikron) ve filtre edilen kısmın ilk 20 ml'si (yaklaşık olarak) atılır.

Filtre edilen örnekler aynı gün analiz edilmelidir, aksi durumda uygun bir yöntemle korunmalıdırlar, örneğin, 0,05 ml civa klorür($HgCl_2$) süzülen kısmının her 10 ml.sine eklenir ve bu hacim 2 ila 4 °C sıcaklıkta 24 saat saklanabilir yada -18 °C de daha uzun periyotlarda saklanabilir.

Alıştırma zamanı, test maddesinin eklenmesi ile birlikte, altı haftayı geçmemelidir ve değerlendirme periyodu 3 haftadan az olmamalıdır yani, sonucun hesaplanması için 14 ila 20 ölçüm yapılmalıdır.

Eşleşmiş üniteler modu

Birimlerin eşlenmesi günde iki kere birimler arasında aktif çamur havalandırma kabından, test içeren ana sıvının 1,5 litresinin değiştirilmesi ile sağlanır. Güçlü absorplayıcı test maddelerde olması durumunda, çöktürme kabından 1,5 litre üst sıvı alınır ve diğer ünitenin aktif çamur kabına dökülür.

1.6.2.3. Analizler

Maddenin davranışını belirlemek için iki tür analiz yürütülür.

DOC ve COD

DOC derişimleri karbon analizörü ile ve/veya referans (2)'ye göre COD değerleri ile yapılır.

Özgül analiz

Test maddelerinin derişimleri uygun bir yöntem ile belirlenir. Eğer mümkünse çamur üzerine absorbe edilen maddenin özgül tayini yapılmalıdır.

2. VERİLER VE DEĞERLENDİRME

2.1. Eşleşmiş üniteler modu

Eşleşmiş üniteler modu kullanıldığında günlük uzaklaştırma derecesi, DR 1.2.1'e göre hesaplanır.

Bu günlük DR uzaklaştırma dereceleri 3 saat için eşitlik [2]'de yada ortalama 6 saat alıkonulma zamanı için eşitlik [3] ile ters-aşılama işlemine dayanan malzeme transferi için DRc'ye düzeltilir.

$$DRc = \frac{4}{3}DR - \frac{100}{3} \qquad [2]$$

$$DRc = \frac{8}{7}DR - \frac{100}{7} \qquad [3]$$

DRc değerlerinin ortalaması ve ek olarak standart sapması eşitlik [4] ile hesaplanır.

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\overline{DRc} - DRc_i\right)^2}{n-1}} \qquad [4]$$

burada:

S_{DRc}= DRc değerlerinin standart sapması

$\overline{DRc}$= ortalama DRc değeri

N= tayin sayısıdır.

DRC serilerindeki aykırı değerler uygun bir istatiksel işleme, örn Nalimov (6)'ya göre bertaraf edilir.
%95 olasılık seviyesi ve aykırıdeğer içermeyen DRC veri setinin ortalama ve standart sapması yeniden hesaplanır.

Son sonuç, eşitlik [5] ile hesaplanır.

$$DRc = \overline{DR}c \pm \frac{t_{n-1;\alpha}\,{}^{S}}{\sqrt{n}} DRc \qquad [5]$$

$t_{n-1};\alpha$ = E ve E_0 çiftlerinin t tablo değeri ve istatiksel güven P(P=1- α) P en az % 95

Bu sonuç %95 olasılık seviyesinde, standart sapma ve aykırıdeğer içermeyen DRc veri seti veri sayısında ve aykırı değer sayısı, vb göre tolerans limitleri ile ortalama olarak belirtilir.

Drc= 98,6 ± 2,3 % DOC uzaklaştırması,

S= 4, 65 % DOC uzaklaştırması,
N=18,
X= aykırı değer sayısı

2.2. Eşleşmemiş üniteler modu

Ünitelerin performansı aşağıdaki gibi kontrol edilebilir:

$$\text{DOC yada COD'nin yüzde uzaklaştırılması} = \frac{\text{COD yada DOC (atıksuda)- COD yada DOC (çıkış sıvısında)}}{\text{COD yada DOC (atıksuda)}} \times 100$$

Bu günlük uzaklaştırmalar herhangi bir değişimi, örneğin ortama alıştırma gibi, göstermek için grafiksel olarak belirtilebilir.

2.2.1. COD/DOC Tayinlerinin kullanımı

Günlük DR uzaklaştırılma derecesi 1.2.1 'e göre hesaplanır.

DR değerlerinin ortalaması ve ek olarak standart sapması eşitlik [6] ile hesaplanır.

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\overline{DR} - DR_i\right)^2}{n-1}} \qquad [6]$$

Burada;

^{S}DR= DR_i değerlerinin standart sapması

$\overline{DR}$=ortalama DR_i değerleri

n= tayin sayısıdır.

DR serilerindeki aykırı değerler uygun bir istatistiksel işleme, örneğin Nalimov(G)' ya göre bertaraf edilir, %95 olasılık seviyesi ve aykırı değer içermeyen DR setinin ortalama ve standart saoması yeniden hesaplanır.

Son veri eşitlik [7] ile hesaplanır.

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}\, s}{\sqrt{n}} DR \qquad [7]$$

Burada ;
$t_{n-1};\alpha$ = E ve E_0 çiftlerinin t tablo değeri ve istatiksel güven P(P=1- α) P en az % 95

Bu sonuç %95 olasılık seviyesinde, standart sapma ve aykırı değer içermeyen DRc veri seti veri sayısında ve aykırı değer sayısı, vb göre tolerans limitleri ile ortalama olarak belirtilir.

Drc= 98,6 ± 2,3 % DOC uzaklaştırması,

S= 4, 65 % DOC uzaklaştırması,
N=18,
X= aykırı değer sayısı

2.2.2. Özgül analizin kullanılması

Maddenin sulu fazdan(R_w) yüzde giderimi 1.2.2 ye göre hesaplanır.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, eğer mümkünse, aşağıdakileri içermelidir.
- Ek-III'te verilen ve testin çalışma koşullarını belirten form metni
- hangi düzeneğin kullanıldığı
- hangi çalıştırma modunun seçildiği (eşleşmiş üniteler modu yada değil
- atıksu türü –sentetik yada evsel; evselin kullanılması durumunda örneğin tarih ve yeri
- aşı türü; tarih ve yeri ile birlikte
- özgül analiz yürütüldüyse, sıvı fazdan test maddesinin uzaklaştırılma yüzdesinin zaman göre grafiği (alıştırma ve hesaplama periyodu ile)
- test maddesinin ortalama DOC ve COD değerleri ve standard sapması hesaplama periyodunda test maddesi sabit bir plato değerine ulaştığında hesaplanır.
- aktif çamur derişiminin zaman akışı grafiği
- aktif çamura ilişkin herhangi bir uyarı (fazla miktarın atılması, demir (III) klorürün eklenmesi gibi)
- testte kullanılan maddenin derişimi
- çamur üzerinde yapılan analize ilişkin herhangi bir sonuç
- test maddesine ve eğer kullanıldıysa referans maddesine ilişkin bütün deneysel sonuçlar ve bilgiler

- yöntemde eğişiklik olması durumunda her türlü bilimsel sebep

3.2. Sonuçların yorumu

Test maddesinin sulu fazdan düşük oranda uzaklaştırılması mikroorganizmaların test maddesi tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanabilir. Bu çamurun parçalanması ve kaybı sonucunda, bulanık bir üst sıvı oluşması ile yada yeterli desorpsiyon ile pilot tesisteki COD ve ya DOC uzaklaştırma etkinliğinin azalması ile de anlaşılabilir.
Fizikokimyasal adsorpsiyon bazen rol oynayabilir. Molekül üzerindeki biyolojik etki ve fizikokimyasal adsorpsiyon arasındaki farklar yeterli desorpsiyon sonrası çamurun analizi soncunda ortaya çıkarılabilir.

Biyolojik bozunma (yada kısmi biyolojik bozunma) ile adsorpsiyon arasında ayırt edicilik varsa ilave testler yürütülmelidir. Bu pek çok yolla yapılabilir fakat en ikna edici olanı üst sıvının temel-set testinde (tercihen respirometik test) aşı olarak kullanılmasıdır.

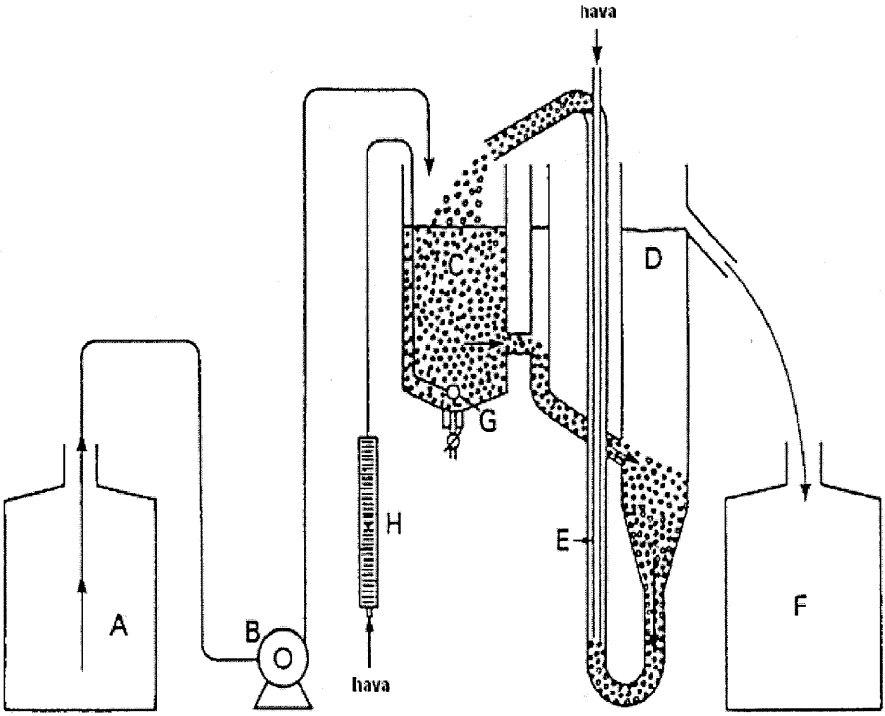
Eğer yüksek DOC yada COP uzaklaştırması gözleniyorsa öyleyse bu biyobozunmadan dolayıdır ancak düşük uzaklaştırmalarda biyobozunma tamamen giderilme olayından ayırt edilemez. Örneğin, çözünür bir bileşik %98'lik yüksek bir adsorpsiyon sabiti gösteriyorsa ve artık çamur yok olma hızı günlük %10 ise, %40' a varan bir yok olma mümkündür. Artık çamur yok olma hızı adsorpsiyona bağlı günlük %30 ve artık çamura bağlı uzaklaştırma %65'lere varabilir.

Özgül analiz yapıldığında maddenin yapısı ve kullanılan analitik yöntem arasındaki ilişkiye dikkat edilmelidir. Bu durumda gözlenen olay maddenin mineralizasyonu olarak yorumlanamaz.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.
(2) Annex V C9 Degradation Test -Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, Official Journal of the European Communities, No L 251,19.9.1984.
(3) Painter, H. A., King, E. F., WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.
(4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161 to 171.
(5) Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, Official Journal of the European Communities, No L 109, 22. 4. 1982, amending Council Directives 7Y404/EEC and 73/405 /EEC on biodegradability of detergents, Official Journal of the European Communities, No L 347, 17. 12. 1973.
(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreßertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Oberprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, Fresenius- Zeitschrift für Analytische Chemie, 303 (1980), pp. 406 to 408.

Ek-I



Şekil 1

Anahtar: A=depolama kabı; E=hava emici

B=dozlama cihazı; F=toplayıcı

C=havalandırma hücresi (3 litre kapasiteli); G=havalandırıcı

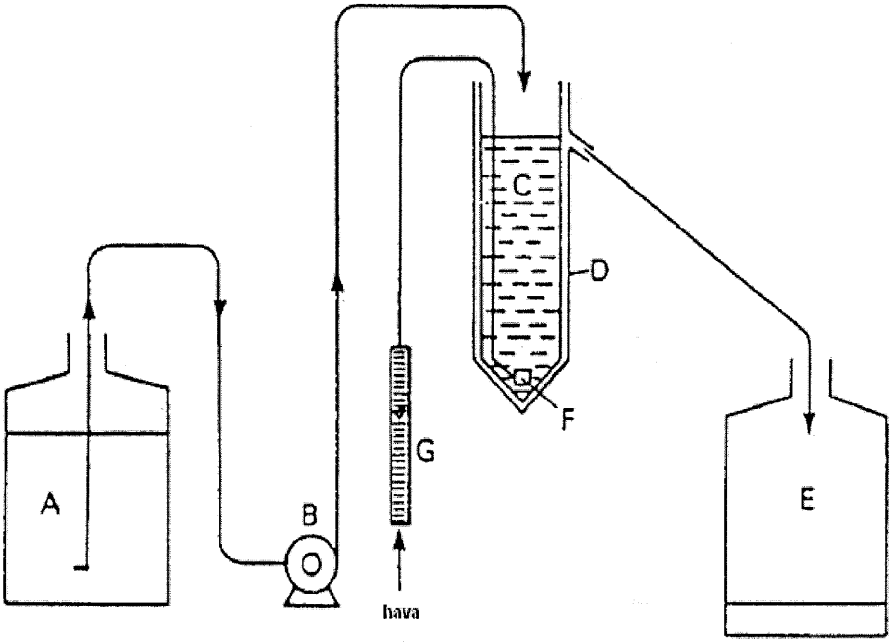
H=hava akış metresi (isteğe bağlı)

D=çökeltme kabı;

Sert PVC
Cam veya su geçirmez plastik (sert PVC)
Sert PVC
Sıvı düzeyi
3 litres

Şekil 2

Ek-II



Şekil 1

Biyolojik bozunma değerlendirmesi için düzenek

Anahtar:

A=depolama kabı;

B=dozlama cihazı;

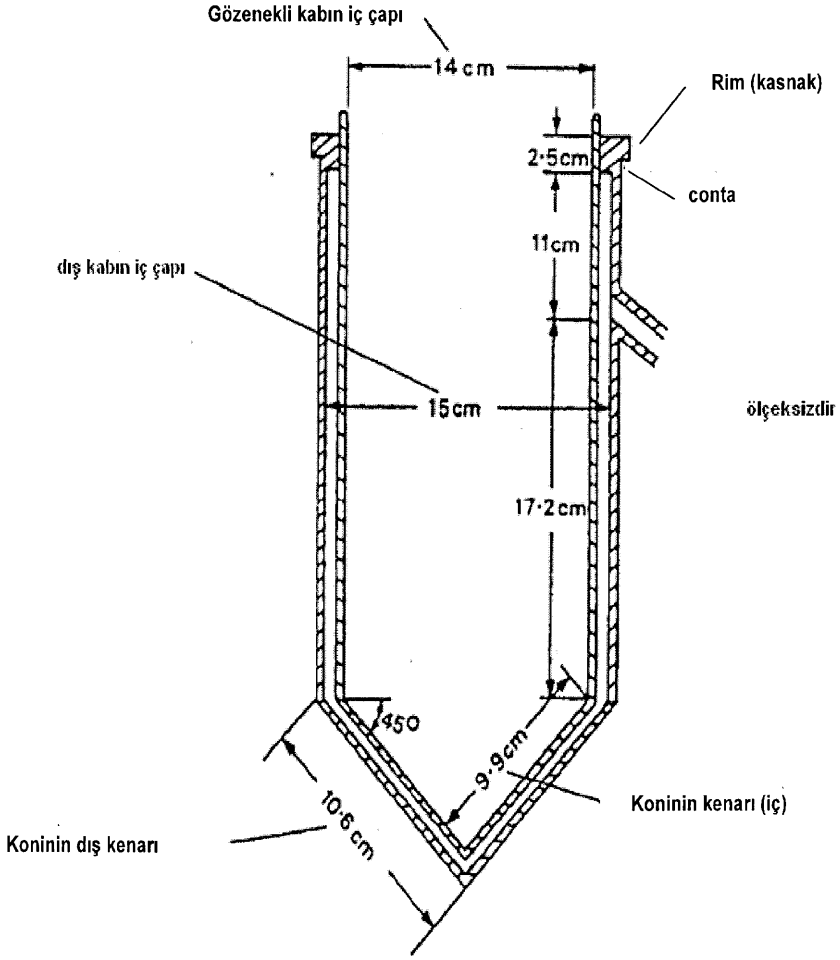
C=gözenekli havalandırma kabı

D=dışı geçirgen olmayan kab

E=çıkış akışı (effluent) toplama kabı

F=difüzyonlu taş havalandırıcı

G=rotametre (isteğe bağlı)



Şekil 2

Üç litrelik gözenekli havalandırma kabının detayları

C.11 BİYOLOJİK BOZUNMA
AKTİF ÇAMUR SOLUNUM İNHİBİSYON TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntem, test maddesinin mikro-organizmalar üzerine etkisini test maddesinin farklı derişimlerinde mikroorganizmanın belirli şartlarda solunum hızını ölçerek değerlendirir.

Bu yöntemin amacı aerobik mikrobiyal arıtma tesislerini olumsuz etkileyecek maddeleri hızlı bir izleme metodu ile izlemek ve biyolojik bozunurluk testlerinde kullanılabilecek inhibitör etkisi göstermeyen konsantrasyonları belirlemektir.

Kesin testten önce bir aralık bulma testi yapılabilir. Bu test ana testte kullanılacak olan derişimler hakkında bilgi sağlar.

Test tasarımı test kontrol maddesi olmadan iki kontrol içermektedir. Bunlardan birisi başlangıçta diğeri ise test serilerin sonundadır. Her bir aktif çamur serisi referans bir madde kullanılarak test edilir.

Bu yöntem en kolay, suda az çözünürlükleri ve düşük uçuculukları sebebiyle suda kalmaya eğimli maddelere uygulanır.
Test ortamında, az çözünürlüğe sahip maddeler için, EC_{50} 'nin belirlenmesi mümkün olmayabilir.
Oksijen alımına bağlı sonuçlar, test maddesi oksitleyici fosforilisayonun bağlarını çözme eğiliminde ise yanlış sonuçlara yol açabilir.

Testte aşağıdakilerin bilinmesi yararlı olabilir:
- sudaki çözünürlük,
- buhar basıncı,
- yapısal formül,
- test maddesinin saflığı.

Tavsiye
Aktif çamur potansiyel patojenik organizmalar içerebilir ve bu yüzden dikkatlice ele alınmalıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Aerobik çamurdaki atık su mikroorganizmalarının oksijen tüketim hızı genellikle saatte çamurun miligramına düşen mg O_2 olarak ifade edilir.

Test maddesinin belli bir derişimde inhibitör etkisini hesaplamak için, solunum hızı iki kontrolün solunum hızlarının ortalamasının yüzdesi olarak verilir.

Yüzde inhibisyon:

$$\left(1-\frac{2R_s}{R_{c1}+R_{c2}}\right)x100$$

olarak verilir.

burada:

R_s = test maddesini test edilen derişiminde oksijen tüketim hızı
R_{c1}= Oksijen tüketim hızı, kontrol 1
R_{c2}= Oksijen tüketim hızı, kontrol 2

Bu yöntemdeki EC_{50} değeri kontrol maddesinin aynı şartlarda gösterdiği solunum hızının %50'sini gösteren test maddesi derişimidir.

1.3. Referans maddeler

Solunumu bilinen bir inhibitör olarak 3,5 diklorofenol'ün referans maddesi olarak kullanımı önerilmiştir ve bu her bir aktif çamur serisinde (batch) EC_{50} değerinin bulunması ve çamurun duyarlılığının anormal olmadığını kontrol etmek için test edilir

1.4. Test yönteminin ilkesi

Standart bir miktarda sentetik çamurla beslenen aktif çamurun solunum hızı 30 dakika yada 3 saat temas zamanından sonra yada her iki şekilde de ölçülür. Test maddesinin değişik konsantrasyonlarını içeren aynı aktif çamurun solunum hızı ölçülür, aksi takdirde aynı koşullarda ölçülmelidir.

Test maddesinin belirli bir derişimdeki inhibitör etkisi iki kontrolün ortalama solunum hızlarının yüzde oranı olarak belirtilir. Farklı derişimlerden belirlenmiş bir EC_{50} değeri hesaplanır.

1.5. Kalite kriterleri

Test sonuçları eğer:

- iki kontrolün solunum hızları birbirinin %15'indeyse;
- 3,5 diklorofenolün EC_{50} (yarım saat ve/veya üç saat) değeri kabul edilen aralık olan 5 ila 30 mg/litre arasında;
ise geçerlidir.

1.6. Test yöntemlerinin tanımlanması

1.6.1. Reaktifler

1.6.1.1. Test maddesinin çözeltileri

Test maddesinin çözeltileri çalışmanın başında taze olarak stok çözeltiden hazırlanır.
Aşağıda önerilen işlemler takip edilecekse 0,5 mg/litre derişimde bir stok çözelti yeterlidir.

1.6.1.2. Kontrol maddesinin çözeltisi

3,5 diklorofenol'ün çözeltisi hazırlamak için 0.5 g 3,5 diklorofenol 10 ml 1 M NaOH içinde çözülür, distile su ile 30 ml'ye seyreltilir ve üzerine karıştırarak tam çökmenin başlangıcına kadar 0.5 M H_2SO_4 eklenir ve - bunun için yaklaşık 8 ml 0,5 mL H_2SO_4 gereklidir-son olarak karışım damıtık su ile 1 litreye tamamlanır. Bu işlemden sonra ortamın pH değeri 7 ila 8 arasında olmalıdır.

1.6.1.3. Sentetik lağım suyu

Sentetik lağım suyu beslemesi aşağıdaki miktarlar 1 L suda çözünerek hazırlanır.
Sentetik besleme yada evsel kanalizasyondan herhangi birisi kullanılabilir.

Pepton: 16 gr,
Et ekstraktı: 11 gr,
Üre: 3 gr,
NaCl: 0,7 gr,
$CaCl_2 .2H_2O$: 0,4 gr,
$MgSO_4 .7H_2O$: 0,2 gr,
K_2HPO_4: 2,8 gr.

Not 1 : Bu sentetik lağım suyu 11 Haziran 1976 'da yayımlanan "Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents" başlıklı OECD teknik raporundaki derişimlerden 100 kat daha konsantredir ve ayrıca dipotasyum hidrojen fosfat ilave edilmiştir.
Not2: Eğer hazırlanan ortam hemen kullanılmaz ise, 0 ila 4 °C arasında karanlıkta, bileşiminde herhangi bir değişiklik yaratmayacak koşullarda bir haftayı geçmeyecek şekilde saklanabilir. Ortam ayrıca saklanmadan önce sterilize edilebilir yada pepton yada et özütü test yürütülmeden biraz önce eklenebilir. Kullanım öncesi iyice karıştırılmalı ve pH ayarlanmalıdır.

1.6.2. Düzenek

Ölçüm düzeneği: hassas tasarım kritik değildir. Ancak tepe boşluğu bulunmalıdır ve prob ölçüm cam balonunun boynuna tam olarak ve sıkıca oturmalıdır.

Normal labaratuvar ekipmanı ve özellikle aşağıdakiler gereklidir.
- ölçüm düzeneği
- havalandırma aleti
- pH elektrodu ve ilgili ölçüm ekipmanı
- oksijen elektrodu

1.6.3. Aşının hazırlanması

Temel olarak evsel kanalizasyon suyu arıtma tesisinden toplanan aktif çamur, testte mikrobiyal aşı olarak kullanılır.

Eğer gerekiyorsa, laboratuvara dönüşte, kalın parçacıklar 15 dak. gibi kısa bir sürede çöktürülerek uzaklaştırılabilir ve üst kısımdaki ince katıların bulunduğu sıvı kısım atılarak kullanılabilir. Alternatif olarak çamur harmanlayıcı ile birkaç saniye karıştırılabilir.

Ek olarak, eğer inhibitör maddenin bulunduğu düşünülüyorsa, çamur çeşme suyu ile yada izotonik su ile yıkanabilir. Santrifuj edildikten sonra, üst sıvı atılır (bu işlem üç kez tekrarlanır).

Çamurun küçük bir miktarı tartılır ve kurutulur Bu sonuçtan, katı oranı 2mg/L yada 4 mg/L olan bir aktif çamur elde etmek için gerekli olan ıslak çamur miktarı belirlenebilir.
Bu düzey test ortamında eğer aşağıdaki işlem takip edilirse 0,8 ila 1,6 g/litre arasında bir derişim verir.

Eğer çamur toplandığı gün kullanılamıyor ise 50 ml sentetik çamur yukarıdakine göre hazırlanan aktif çamurun her bir litresine eklenir daha sonra 20±2 °C de gece boyunca havalandırılır ve gün içinde kullanım için havalandırarak saklanır. Eğer gerekli ise kullanımdan önce pH kontrol edilir ve 6 ila 8'e ayarlanır. Karışım sıvısındaki asılı katılar önceki paragrafta belirtildiği şekilde belirlenir.

Aynı çamur serisi takip eden günlerde kullanılacaksa (azami dört gün), her çalışma gününün sonunda bir litre çamur başına 50 ml sentetik lağım suyu beslenmesi eklenir.

1.6.4. Testin performansı

Süre/Temas zamanı: 30 dakika yada 3 saat,havalandırma esnasında
Su: İçme suyu(kloru giderilmiş, eğer gerekli ise)
Hava kaynağı: Temiz yağsız hava. Hava akışı 0.5-1 litre/ dakika
Ölçüm aleti: BOD şisesi gibi (dibidüz bir şişe).
Oksijen metre: Uygun oksijen elektrodu, kaydedici ile birlikte
Besleme çözeltisi: Sentetik lağım suyu (yukarıda verilen)
Test maddesi: Testin başlangıcında taze hazırlanan çözelti
Referans madde: Örneğin 3, 5 diklorofenol(en az 3 derişimde)
Kontroller:Test maddesi içermeyen aşılanmış örnek
Sıcaklık: 20±2 °C

3 saatlik temas süresinde hem test hem de referans maddesi için önerilen deneysel işlem aşağıda verilmiştir.
Çeşitli kaplar kullanılır: (Örneğin 1 litrelik beherler)
3,2 sabit faktörünü geçmeyen oranlarda değişen en azından 5 derişim kullanılmalıdır.
0 anında 16 ml sentetik kanalizasyon beslemesi 300 ml suya tamamlanır. 200 ml mikrobiyal aşı eklenir ve toplam karışım (500 ml) ilk kaba dökülür (ilk kontrol C_1).

Test kapları çözünmüş oksijen 2.5 mg/litre değerinin altına düşmeyecek şekilde ve solunum hızının ölçümden hemen önce oksijen derişimi 6,5 mg/litre olacak şekilde sürekli havalandırılmalıdır.

15 dakika anında (15 dakika gelişigüzel bir sayıdır ancak uygun bir aralıktır) yukarıdakiler tekrarlanır ve bunlardan farklı olarak 100 ml test maddesi stok çözeltisi mikrobiyal aşı toplam hacmi 500 ml yapacak şekilde eklenmeden önce 16 ml sentetik kanalizasyona eklenir. Bu karışım daha sonra ikinci bir kaba alınır ve yukarıdaki gibi havalandırılır. Bu süreç farklı derişimde test maddesi içeren kaplar oluşturacak şekilde farklı hacimler kullanılarak 15 dakika zaman aralıkları ile tekrarlanır. Son olarak ikinci kontrol hazırlanır (C2).

Üç saat sonunda pH kaydedilir ve ilk kabın iyi karışmış bir örneği ölçüm düzeneğine dökülür ve solunum hızı 10 dakikaya varan aralıklarla ölçülür.

Bu belirleme her bir kabın içeriğine 15 dakika aralıklarla ve her bir kabın temas zamanı 3 saat olacak şekilde tekrarlanır.
Referans maddesi her bir aşı grubunda aynı şekilde test edilir.
Ölçümler 30 dakika temas zamanından sonra yapılacaksa farklı bir sistem (örneğin birden fazla oksijen metre) gereklidir.
Eğer kimyasal oksijen tüketiminin ölçümü gerekiyorsa, test maddesi, sentetik kanalizasyon,ve su içeren ancak aktif çamur içermeyen başka kaplar hazırlanır. Oksijen tüketimi ölçülür ve 30 dakika ile 3 saat havalandırma zamanı sonrasında kaydedilir.

2. VERİLER VE DEĞERLENDİRME

Havalandırma hızı kaydediciden 6,5 mg O_2/L yada 2,5 mg O_2/L arasında hesaplanır yada eğer solunum hızı düşükse 10 dakikalık süre sonunda hesaplanır. Solunum eğrisinin solunum hızının hesaplandığı kısmı doğrusal olmalıdır.

Eğer iki kontrolün solunum hızları biri diğerinin % 15'i seviyesinde değilse yada referans maddenin EC_{50} değeri(30 dakika yada 3 saat) kabul edilebilir aralıkta değilse (3,5 diklorofenol için 5 ila 30 mg/litre) test geçerli değildir ve tekrarlanmalıdır.

Yüzde inhibisyon testte kullanılan her derişimde hesaplanır (bakınız 1.2). Yüzde inhibisyon logaritmik (veya log-olasılık)kağıtta derişime karşı grafiğe geçirilir ve EC_{50} değeri türetilir. EC_{50} değerleri %95 güven aralığında standard işlemler kullanılarak belirlenebilir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, eğer mümkünse, aşağıdakileri içermelidir.
- test maddesi: Kimyasal açıklama verisi ile
- test sistemi: kaynak, derişim ve aktif çamurun ön muamelesi
- test koşulları:
- solunum ölçümünden önce karışımın pH değeri
- test sıcaklığı

- test süresi
- referans maddesi ve ölçülen EC50 değeri
- abiyotik oksijen alımı (eğer varsa)

Sonuçlar:
- bütün ölçülen veriler
- inhibisyon eğrisi ve EC50'nin hesaplanmasındaki metot
- EC 50 ve eğer mümkünse, %95 güven aralığında EC20 ve EC80 değerleri
- sonuçların etkilenebileceği test yönteminden tüm sapmalar ve tüm gözlemler

3.2. Sonuçların yorumlanması

Çevredeki karmaşık etkileşimler laboratuvarda tam olarak modellenemediği için EC_{50} değeri test maddesinin aktif çamura yada atık su organizmalarına karşı olan toksisitesinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. İlaveten, amonyak yükseltgenmesini inhibitör olarak etkileyebilecek test maddeleri alışılmamış inhibisyon eğrileri oluşturabilir. Bundan dolayı bu tür eğriler yorumlanırken dikkat edilmelidir.

4. KAYNAKLAR

(1) International Standard TS 10868 ISO 8192.
(2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11,1977, p. 165.
(3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.
(4) ETAD (Ecological and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries),
(5) Recommended Method No 103, also described by:
(6) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, p. 80.
(7) Schefer, W., Textilveredlung 6,1977, p. 247.
(8) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, Decision of the Council C(81) 30 final.

C.12 BİYOLOJİK BOZUNMA
DEĞİŞTİRİLMİŞ SCAS TESTİ

1. YÖNTEM

1.1. Giriş

Bu yöntemin amacı uzun bir periyot içerisinde yüksek derişimde mikroorganizmalara maruz kaldığında suda çözünür. Uçucu olmayan organik maddelerin potansiyel en yüksek biyolojik bozunurluklarını hesaplamaktır.

Mikroorganizmaların canlı kalmaları günlük olarak çöktürülmüş kanalizasyon suyu beslemesinin eklenmesi ile sağlanır (Haftasonları için gerektiğinde lağım suyu 4°C'de saklanabilir. Alternatif olarak; OECD doğrulama testinde sentetik lağım suyu kullanabilir.).

Asılı katılarda fizikokimyasal adsorpsiyon olabilir ve sonuçların yorumlanmasında bu faktör dikkate alınmalıdır (Bakınız 3.2).

Sıvı fazın alıkonma zamanının yüksek olması (36 saat) ve besinlerin aralıklı eklenmesi dolayısıyla, bu testin sonuçları kanalizasyon suyu arıtma tesisindeki sonuçları birebir yansıtmaz. Değişik test maddeleri ile alınan sonuçlar testin yüksek biyoloijk bozunma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Test tarafından sağlanan koşullar, test maddelerini parçalayabilen mikroorganizmaların seçimi ve/veya adaptasyonu için elverişlidir. (bu yöntem başka testlerde kullanmak üzere iklimlendirilmiş aşı üretiminde kullanılabilir.)

Bu yöntemle çözünmüş organik karbon derişimi test maddelerinin en yüksek biyolojik bozunurluklarını belirlemek için bir ölçü olarak kullanılır. Çözünmüş organik karbon miktarı C_{toplam} -$C_{anorganik}$ şeklinde ifade etmek yerine asitlendirip temizledikten sonra ölçmek tercih edilir.

Özgül bir analitik metodun eşzamanlı kullanımı maddenin birincil biyololijk bozunurluğunun değerlendirilmesini sağlayabilir (Ana kimyasal yapının kaybolması ile)

Yöntem sadece testte kullanılan derişimlere sahip organik test maddelerine uygulanır.
- suda çözünebilen (en az litrede 20 mg çözünmüş organik karbon)
- ihmal edilebilen buhar basıncına sahip olan
- bakteriyi inhibe etmeyen
- test sisteminde önemli adsorbsiyon oluşturmayan
- test çözeltisinde köpük oluşturup kaybolmayan

Test maddesindeki organik karbon içeriği saptanmalıdır.
Test malzemesinin ana bileşenlerinin bağıl oranları hakkındaki bilgi, sonuçlar az veya sınırlar dışında olduğunda, sonuçların yorumlanmasında kullanılabilecektir.
Maddenin mikroorganizmalara karşı toksisitesi hakkındaki bilgi, uygun test derişimlerinin seçiminde ve düşük sonuçların yorumlanmasında kullanılabilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

C_T= havalandırma periyodunun başlangıcında, çöktürülmüş lağım suyuna eklenen veya lağım suyu içinde bulunan organik karbon kadar test maddesinin derişimi (mg/litre);
C_t= havalandırmanın sonunda test sıvısının üst kısmında bulunan çözünmüş organik karbonun derişimi (mg/litre),
C_c= havalandırmanın sonunda kontrol sıvısının üst kısmında bulunan çözünmüş organik karbonun derişimi (mg/litre).

Biyolojik bozunma bu yöntemde organik karbonun kaybolması olarak tanımlanır. Biyolojik bozunma aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

1. Günlük olarak eklenen maddenin günlük bozunma miktarı D_{da}:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} x100$$

[(1)]

D_{da}: Bozunma/Günlük ekleme

2. Her günün başında bulunan maddenin yüzde bozunma değeri D_{ssd}

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} x100$$

[(2)a]

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} x100$$

[(2)b]

D_{ssd}= bozunma/Günün başlangıcındaki başlangıç maddesi

i ve(İ+1) indisleri günlük ölçüm günlerine denk gelir.

Eğer çıkış sıvısı (effluant) günden güne değişiyorsa eşitlik [(2)a]'nın kullanımı tavsiye edilir ancak çıkış sıvısı (effluant) günlük olarak sabit kalıyorsa bu durumda [(2)b] kullanılabilir.

1.3. Referans maddeler

Yeni bir madde araştırırken referans maddelerinin kullanımı yararlı olabilir ancak bu test için önerilebilecek özgül bir referans maddesi yoktur.

Halka testi ile değişik bileşikler için elde edilmiş veriler birincil olarak mevcuttur (eke bakınız) böylelikle zaman zaman yöntemin kalibrasyonu yapılabilir ve başka bir yöntem kullanıldığında sonuçları karşılaştırmak mümkün olabilir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Bir lağım suyu arıtma tesisinden elde edilen aktif çamur yarı-sürekli aktif çamur ünitesine (SCAS) konulur. Test maddesi ve çöktürülmüş evsel kanalizasyon atık suyu eklenir ve karışım 23 saat havalandırılır. Havalandırılma durdurulur, çamurun çökmesi için beklenir ve üst sıvı alınır. Havalandırma hücresinde kalan çamur ve test maddesinin ilave bir hacmi ve lağım suyuyla tekrar karıştırılır ve bu işlem tekrarlanır.

Biyoloijk bozunma üst sıvının organik karbon içeriğinin belirlenmesi ile oluşturulur. Bu değer yalnızca çöktürülmüş lağım suyu ile dozu ayarlanmış test tüpünden bulunan değerle karşılaştırılır. Özgül bir analitik yöntem kullanıldığında ana molekülün derişiminde meydana gelen biyolojik bozunmaya bağlı değişimler ölçülebilir (Birincil biyolojik bozunma)

1.5. Kalite kriterleri

Bu yöntem için çözünmüş organik karbon uzaklaştırılmasına bağlı bir tekrarlanabilirlik henüz oluşturulmamıştır (birincil biyolojik bozunma ele alındığında çok büyük oranda bozunan maddeler için çok kesin değerler elde edilebilir).

Bu yöntemin duyarlılığı her bir tekrarın başlangıcında kör'ün değişkenliğine ve az oranda organik karbon içeriğinin belirlenmesindeki kesinliğe ve test maddesinin sıvıda döngü seviyesine bağlıdır.

1.6. Test yöntemlerinin tanımlanması

1.6.1. Hazırlıklar

Yeterli sayıda temiz havalandırma birimi, bunun için 1.5 litrelik orijinal SCAS test birimi kullanılabilir, her bir test maddesi ve kontroller için hava giriş tüplerinden (şekil 1) oluşan düzenek kurulur. Test ünitelerine sağlanan ve pamuk filtresi ile temizlenmiş ve sıkıştırılmış hava serbest organik karbon içermemelidir ve buharlaşma kayıplarını azaltmak için önceden suyla doyurulmalıdır. 1 ile 4 g/litre askıda katı madde içeren karışmış sıvının bir örneği ağırlıklı olarak evsel kanalizasyon suyu arıtan tesisden alınan aktif çamurdan elde edilir. Her bir havalandırma birimi için bu karışmış sıvıdan yaklaşık 150 ml gereklidir.
Test maddesinin stok çözeltileri saf su kullanılarak hazırlanır. Bu çözelti için genellikle, herhangi bir biyolojik bozunma olmuyorsa her bir havalandırma döngüsünde 20 mg/L karbon test maddesine karşılık gelen 400 mg/litre organik karbon gereklidir.
Mikroorganizmaların toksisitesi imkan veriyorsa daha yüksek derişimler de kullanılabilir.
Stok çözeltilerin organik karbon içeriği ölçülür.

1.6.2. Test koşulları

Bu test 20 ila 25 °C'de yürütülmelidir.

Yüksek derişimde mikroorganizma derişimi kullanılır(1 ila 4 g/L asılı katı) ve alıkonulma zamanı 36 saattir. Kanalizasyon beslemesindeki karbonumsu yapılar normal olarak her bir havalandırma çevriminde önce 8 saat süreyle çok büyük oranda yükseltgenir. Daha sonra çamur geri kalan havalandırma periyoduna kadar bir miktar dinlendirilir. Bu sürede eğer metabolize olmadıysa mevcut bulunan tek madde test bileşiğidir. Bu özellikler evsel

kanalizasyon ortam olarak kullanıldığında testin günlük tekrar aşılaması ile birleştirildiğinde, iklimlendirme ve yüksek derecede biyolojik bozunma için çok elverişli şartlar oluşturur.

1.6.3. Testin performansı

Ağırlıklı olarak evsel aktif çamur tesisinden yada laboratuar biriminden karışmış sıvı örneği alınır ve aerobik ortamda kullanıma kadar saklanır. Her bir havalandırma birimi ve kontrol birimi, 150 ml karışmış sıvı ile doldurulur ve havalandırma başlatılır (eğer orijinal SCAS birimi kullanılıyor ise verilen hacimler 10 ile çarpılır). 23 saat sonunda havalandırma durdurulur ve çamurun çökmesi için 45 dakika beklenir. Her bir kabın kapağı sırasıyla açılır ve 100 ml üst sıvı alınır. Çökmüş evsel kanalizasyon suyu örneği kullanımdan hemen önce elde edilir ve bunun 100 ml'lik kısmı her bir havalandırma biriminde kalan çamura eklenir. Havalandırma tekrardan başlatılır. Bu basamakta test maddesi eklenmez ve birimler yalnızca çökme sonucu berrak bir üst sıvı elde edilinceye kadar evsel kanalizasyon suyu ile beslenir. Bu yaklaşık olarak 2 hafta alır ve bu zaman her bir havalandırma birimindeki üst sıvıdaki çözünmüş organik karbon miktarının sabit bir değer alması için gereken zamandır. Bu sürenin sonunda, ayrı ayrı çöken çamurlar karıştırılır ve oluşan komposit çamurdan 50'şer ml her birime eklenir.

Kontrol birimlerine 95 ml çökmüş lağım suyu ve 5 ml su eklenir ve benzer şekilde test birimlerine 95 ml çökmüş lağım suyu ile birlikte test bileşiği stok çözeltisinden (400 mg/L) 5 ml kısım eklenir. Havalandırma tekrardan başlatılır ve 23 saat sürdürülür. Çamurun çökmesi için 45 dakika beklenir, üst sıvı alınır ve organik karbon içeriğinin belirlenmesi için analiz edilir. Yukarıdaki doldur boşalt işlemi test süresince günlük olarak tekrar edilir.

Çöktürmeden önce sıvı seviyesinin üstünde katı birikiminin önüne geçebilmek için birimlerin duvarlarının yıkanması gerekli olabilir. Çapraz kirliliğin önüne geçmek için her birim için ayrı bir kazıyıcı yada fırça kullanılmalıdır. İdeal olarak, daha az sürelerde de belirlenebilirse de, üst sıvıdaki çözünmüş organik karbon miktarı günlük olarak belirlenir. Sıvılar analizden önce 0.45 mikronluk yıkanmış membran filtreleri ile filtre edilir veya santrifüj edilir. Membran filtreleri süzme aşamasında ne karbonu salacak ne de maddeyi adsorblayacak şekilde olmalıdır. Örneğin sıcaklığı santrfifüj içinde 40 °C'yi geçmemelidir.

Hiç biyolojik bozunmaya uğramayan yada çok az bozunan bileşikler için test süresi belirsizdir, ancak önceki deneyler bu sürenin genel olarak en az 12 hafta olması gerektiği ancak 26 haftayı geçmemesi gerektiğini göstermiştir.

2. VERİLER VE DEĞERLENDİRME

Test ve kontrol birimlerinin üst sıvısındaki organik karbon içeriği zamana karşı grafiğe geçirilir. Biyolojik bozunma olduğunda, test örneğindeki miktar kontroldeki değere yaklaşır. 3 ardışık ölçüm boyunca eğer iki değer arasındaki fark sabit bulunuyorsa, istatistiksel veri değerlendirmesi yapabilmek için yeterli olacak sayıda bu tür ölçümler yapılır ve test bileşiğinin yüzde biyolojik bozunması hesaplanır. (D_{da}, D_{ssd}, bakınız 1.2)

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu, eğer mümkünse, aşağıdakileri içermelidir.

- kullanılan kanalizasyon suyunun ve birimin türü
- test maddesi ve eğer kullanıldıysa referans madde ve kör ile ilgili tüm deneysel sonuçlar ve diğer bilgiler,
- sıcaklık
- hesaplama modu ve açıklaması ile uzaklaştırma eğrisi (Bakınız 1.2)
- aktif çamur ve kanalizasyonun suyunun örneklendirildiği yer ve zaman, adaptasyon durumu, derişim vs.
- test yöntemindeki her hangi bir değişikliğe ilişkin her tür bilimsel sebep
- tarih ve imza

3.2. Sonuçların yorumlanması

Bu testle analiz edilen maddeler kolaylıkla biyolojik bozunabilir olan maddeler olmadığı için, esas olarak biyolojik bozunmaya bağlı olan DOC uzaklaştırması, iklimlendirmenin birkaç hafta sonunda beklenmedik yok olmanın aniden olduğu durumlar dışında,günler ve haftalar boyunca kademeli olacaktır.

Fiziko-kimyasal adsorsiyon bazen önemli rol oynayabilir. Bu başlangıçta eklenen DOC'nin kısmen yada tamamen yok olmasıyla anlaşılır. Daha sonra olan olaylar, adsorpsiyon derecesi, atık akış suyundaki (effluent) asılı katıların derişimi gibi faktörlere bağımlıdır. Genellike test ve kontrol sıvılarındaki DOC değerleri arasındaki fark başlangıçtaki az bir değerden giderek artar ve bu değer deneyin geri kalan kısmında, iklimlendirme olmadıkça, sabit bir değere ulaşır.

Biyolojik bozunma (veya kimsi biyolojik bozulma) ve adsorpsiyon arasındaki bir farklılık olursa ilave testler yürütülür. Bu işlem birkaç yoldan yapılabilir. Ancak en ikna edici olanı üst sıvı yada çamuru temel seri testinde aşı olarak kullanmaktır (Tercihen respirometik test).
Bu testte yüksek ve adsorbe edici olmayan DOC değerleri veren test maddeleri potansiyel biyolojik bozunur olarak değerlendirilebilir. Adsorbe edici olmayan kısmi uzaklaştırma kimyasalın en azından az miktarda biyolojik bozunmaya uğradığını gösterir.

Düşük yada sıfır DOC(yada COD) uzaklaştırma değerleri test maddesinin mikroorganizmalar tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanabilir ve bu çamurun azalması ve parçalanmasıyla bulanık üst sıvı oluşturması ile anlaşılabilir. Test, test maddesi daha düşük bir konsantrasyonda verilerek tekrar edilmelidir.

Bileşiğe özgü bir analitik metodun kullanımı yada ^{14}C işaretli test maddesi kullanımı daha büyük bir hassasiyet sağlayabilir.

^{14}C işaretli bileşikte, $^{14}CO_2$ geri kazanımı biyolojik bozunmanın gerçekleştiğini doğrular.
Sonuçlar birincil biyolojik bozunma cinsinden verildiğinde, eğer mümkünse ana test maddesinin cevap kaybına yol açan kimyasal yapı değişikliğine ilişkin bir açıklama verilmelidir.

Yöntemin analitik geçerliliği kör test ortamında bulunan test sonucu ile birlikte verilmelidir.

4. KAYNAKLAR

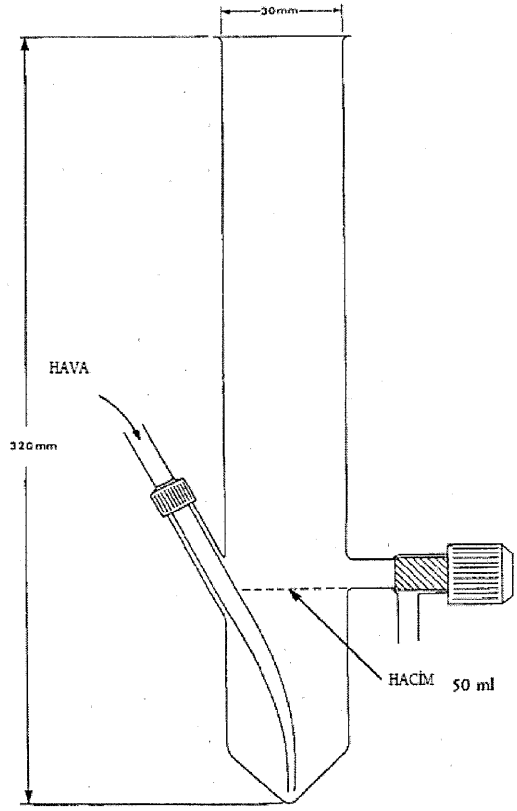
(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, Decision of the Council C(81) 30 final.

Ek-I

SCAS testi: sonuçların örneği

MADDE	C_T (mg/L)	C_T- C_C (mg/L)	Yüzde biyolojik bozunma D_{Da}	Test süresi (gün)
4 asetil aminobenzen sülfonat	17,2	2,0	85	40
Tetra propilen benzen sülfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilen glikol	16,5	0,2	98,8	40
anilin	16,9	1,7	95,9	40
Siklopentan tetra karboksilat	17,9	3,2	81,1	120

Ek-II



Şekil 1
Test düzeneği örneği

C.13 BİYOLOJİK KONSANTRASYON
İÇ-AKIŞ BALIK TESTİ

1. YÖNTEM

Bu biyolojik konsantrasyon yöntemi OECD TG 305(1996) yöntemi ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu yöntem, maddelerin iç-akış koşullarındaki biyolojik konsantrasyon potansiyellerini tanımlamak için bir işlem açıklar. İç-akış test şartları daha tercih edilebilir olsa da, yarı-durağan şartlar eğer geçerlilik ölçütlerini sağlıyorsa müsaade edilebilirdir.

Bu yöntem testi yürütmek için ve test maddelerinin değişen özellikleri için deneysel düzeneği özel laboratuvar koşullarına uyarlama özgürlüğü sağlayacak yeterli ayrıntı verir. Bu yöntem en çok log P_{ow} değerleri 1.5 ve 6.0(1) arasında değişen kararlı organik kimyasallara uygulanabilir ancak log P_{ow} değerleri 6'dan büyük olan aşırı yağ seven(süperlipofilik) maddelere de uygulanabilir. Bazen K_B olarak da ifade edilen biyolojik konsantrasyon faktörünün (BCF) bu tür süper yağ seven maddeler için olan ön-kestirimi (ön tahmini) laboratuvar deneylerinden elde edilen yatışkın-hal-biyolojik konsantrasyon faktörü (BCF_{ss}) değerinden muhtemelen daha yüksek olacaktır.
log P_{ow} değerleri 9'a kadar olan organik kimyasallar için biyolojik deriştirme faktörünün ön-belirlemesi Bintein eşitliği kullanılarak elde edilebilir (2) nci Biyolojik konsantrasyon potansiyelini tanımlayan katsayılar, alım hız sabiti (k_1), atılım hız sabiti (k_2) ve BCF_{ss}'tir.

Radyoaktif işaretli test maddeleri suyun ve balık örneklerinin analizini kolaylaştırabilir ve bozunan tanımlamasını ve miktarlandırılmasının yapılıp yapılamayacağını belirlemede kullanılır. Eğer toplam radyoaktivite kalıntıları ölçülürse(örneğin yanma ya da doku çözünürleştirmesi ile), BCF; ana bileşiğe, artık herhangi bir metabolit (metabolizmada oluşan) ve ayrıca özümlenmiş karbona dayanır. Dolayısıyla, toplam radyoaktif kalıntıya dayanan BCF'ler sadece ana bileşiğin özgül kimyasal analizinden türetilmiş BCF ile doğrudan karşılaştırılabilir değildir.

Ana bileşiğe dayanan BCF tespitinde radyoaktif işaretleme çalışmaları için temizleme işlemleri uygulanabilir ve gerekli görülürse ana metabolitler tanımlandırabilir. Ayrıca dokulardaki kalıntıların analizi ve tanımlanması ile bir balık metabolizma çalışmasını, biyolojik konsantrasyon çalışması ile birleştirmek mümkündür.

1.2. Tanımlar ve birimler

Biyolojik konsantrasyon/biyolojik birikim test maddesinin çevresel ortamdaki test maddesi derişimine kıyasla, organizmadaki (ilgili organlarında) derişiminde meydana gelen artıştır.

Biyolojik konsantrasyon faktörü (BCF yada K_B) bu birikim testinin alım evresindeki herhangi bir anda, doku yada tanımlı dokulardaki test maddesi derişiminin [C_f µg/g olarak (ppm)], çevresel ortamdaki test maddesi derişimine bölümüdür [C_w µg/g olarak (ppm)].

Yatışkın-hal biyolojik konsantrasyon faktörü (BCF yada K_B) uzun bir periyotta kayda değer ölçüde değişmez ve test maddesinin çevreleyici ortamda derişimi aynı periyotta sabittir.

Plato yada yatışkın hal balıktaki test maddesinin [C_f] zamana karşı çizilen grafiğinde, eğri zaman eksenine paralel olduğunda ve en az 3 gün arayla alınan örneklerdeki C_f değeri, üç ardışık analizde birbirinin ± 20%'si içindeyse ve üç örnekleme periyodunda kayda değer bir farklılık yoksa ulaşılır. Biriktirilmiş örnekler analiz edildiğinde, en azından 4 ardışık analiz gereklidir. Daha yavaş aralıklarla alınan örnekler için aralıkların 7 günlük olması daha uygundur.

Biyolojik konsantrasyon faktörleri doğrudan kinetik hız sabitlerinden(k_1/k_2) hesaplandığında bunlar BCFolarak tanımlanır.

Oktanol/ Su dağılım katsayısı (P_{ow}) kimyasalın n-oktanoldeki çözünürlüğünün dengedeki suya oranıdır(Yöntem A.8) ve K_{ow} olarak ta tanımlanır. P_{ow} 'ın logaritması, kimyasalın sucul organizmaları tarafından biyolojik konsantrasyon potansiyelinin bir belirteci olarak kullanılır.

Maruz kalma ya da alım evresi balıkların test kimyasalına maruz kaldıkları zamandır.

Alım hız sabiti (k_1) Balık test maddesine maruz kaldığında balıkta (ya da ilgili dokusunda) test maddesinin konsantrasyonundaki artışı açıklayan sayısal değerdir.(k_1, $gün^{-1}$ olarak ifade edilir.)
Maruz kalma sonrası ya da atılım evresi test balığının test maddesi içeren ortamdan test maddesi içermeyen ortama alındıktan sonra test maddesinin balıktaki (ya da ilgili dokusunda) atılmasının (kaybının) çalışılmasında geçen zamandır.

Atılma (kayıp) hız sabiti (k_2), balığın test maddesi içeren ortamdan test maddesi içermeyen ortama alınmasını takiben, test maddesinin test balığındaki konsantrasyonundaki azalma miktarının sayısal değeridir.(k_2, $gün^{-1}$ olarak ifade edilir)

1.3. Test yönteminin ilkesi

Test iki evreden oluşmaktadır:

Maruz kalma (alım) evresi ve maruz kalma sonrası (atılım) evreleri vardır. Tutunma evresi boyunca, tek bir türden oluşan ayrı balık grupları test maddesinin en az iki farklı derişimine maruz bırakılır. Daha sonra atılım evresi için test maddesi içermeyen bir ortama alınırlar. Alım evresinde maddenin alımı önemsiz (örneğin 10'dan küçük BCF değerinde) değilse bir atılım evresi her zaman gereklidir. Test maddesinin balığın içindeki/üzerindeki (yada ilgili dokusundaki) konsantrasyonu testin her iki evresinde de izlenir. Biyolojk konsantrasyon testinde gözlenebilecek olası olumsuz etkileri ilişkilendirmek ve test maddesi için zemin derişimleri oluşturmak için iki test derişimine ek olarak, bir grup kontrol balığı sadece test maddesi içermeyen ve diğer bütün şartları aynı olan bir ortamda tutulur.

Alım evresi, daha önce dengeye geldiği gözlenmiyorsa 28 gün devam ettirilir. Alım evresinin uzunluğunun tahmini ve yatışkın hal zamanının tahmini Ek-III'teki eşitlik kullanılarak belirlenebilir.

Atılım evresi, test balığının yalnızca test maddesi içermeyen ama diğer bütün şartları aynı olan ortama temiz bir tank içine aktarılması ile başlatılır. Mümkün olduğu durumda, biyolojik konsantrasyon faktörü (C_f) $BCF_{SS,}$ tercihen hem balığın konsantrasyonunun görünür yatışkın halde sudaki konsantrsayona (C_w) oranı hem de kinetik biyolojik konsantrasyon faktörü, BCF_k,birinci derece kinetik varsayılarak, alım (k_1) ve atılım (k_2) hızları oranı olarak

hesaplanır. Eğer birinci derece kinetiğe uyulmuyorsa, daha karmaşık modeller kullanılabilir.(Ek -V)

Eğer 28 gün içinde yatışkın hale ulaşılmıyorsa, alım evresi, yatışkın hale ulaşılıncaya kadar yada 60 güne kadar,hangisi önce geliyorsa, uzatılmalıdır ve daha sonra atılım evresine başlanmalıdır.

Alım hız sabiti, atılım (kayıp) hız sabiti(ya da daha karmaşık modeller kullanılıyorsa hız sabitleri), biyolojik konsantrasyon faktörü ve mümkün oluyorsa bu parametrelerin güven aralığı, test maddesinin balıkta ve suda ölçülen derişimlerini en iyi açıklayan modele göre hesaplanır.

BCF, balığın toplam ıslak ağırlığının fonksiyonu olarak ifade edilir. Ancak özel amaçlar için, eğer balık yeterince büyükse belirli doku ya da organlar (karaciğer, kas gibi) kullanılabilir yada balık yenilebilir(fileto) yada yenilmez parçalara bölünür. Pek çok organik madde için biyolojik konsantrasyon potansiyeli ve yağ severlilik(lipofilisite) arasında açık bir ilişki bulunduğu için bu maddeler için gözlenen biyolojik konsantrasyon ve test balığının yağ içeriği arasında da bir ilişki vardır. Bu yüzden yüksek yağı seven özellikteki bileşiklerdeki bu tür değişkenliği azaltmak için(örn. log P_{ow}>3) biyolojik konsantrasyon toplam vücut ağırlığı yanında lipit içeriği cinsinden de belirtilmelidir.

Uygulanabilir olduğunda, lipit içeriği test maddesinin konsantrasyonunun belirlendiği aynı biyolojik örneklerde belirlenmelidir.

1.4. Test maddesi hakkında bilgi

Biyolojik konsantrasyon için testi yürütmeden önce, test maddesi hakkında aşağıdaki bilgiler bilinmelidir:

a) Sudaki çözünürlük
b) Oktanol/su dağılım katsayısı P_{ow} (A.8'deki HPLC metodu ile belirlendiğinde K_{ow})
c) Hidroliz
d) Biyolojik konsantrasyon testi için ışınlama şartlarında güneşsel yada uyarılmış güneş ışınlarında sudaki ışıkla dönüşüm
e) Yüzey gerilimi (P_{ow}'un belirlenemediği maddeler için)
f) Buhar basıncı
g) Kolay biyobozunma (uygunsa)

Gereken diğer bilgiler bu testte kullanılan balıklar için toksisitedir. Bu tercihen asimptotik (zamandan bağımsız) LC_{50} değeridir. Örnek hazırlama ve saklama koşulları ile birlikte test çözeltileri ve biyolojik malzeme için bilinen bir kesinlikte, doğrulukta ve duyarlılıkta uygun bir analitik yöntem mevcut olmalıdır.

Suda ve balık dokusunda test maddesinin analitik tayin sınırı ayrıca bilinmelidir. ^{14}C ile işaretli test maddesi kullanıldığında, safsızlıklardan kaynaklanan radyoaktivite bilinmelidir.

1.5. Testin geçerliliği

Testin geçerli olabilmesi için aşağıdaki koşullar sağlanmalıdır:

- Sıcaklık değişimi ±2 °C'tan azdır.
- Çözünmüş oksijenin doygunluğu %60'dan aza düşmez.
- Ölçüm bölmelerindeki test maddesi konsantrasyonu alım evresindeki ölçülen değerlerin ortalamasının ±%20'si içinde tutulur.
- Testin sonunda kontrol ve test balıklarındaki ölümlülük ve diğer olumsuz etkiler/hastalıklar %10'dan azdır. Test birkaç hafta yada aylara genişletildiği
- durumlarda ise ölüm yada diğer olumsuz etkiler her iki grupta da aylık %5'ten azdır ve toplamda da %30'geçmez.

1.6. Referans maddeler

Bilinen biyolojik konsantrasyon potansiyelindeki referans maddelerin gerektiğinde kullanımı deneysel prosedürü kontrol etmek için yararlı olabilir. Ancak özel maddeler henüz önerilmemiştir.

1.7. Test yönteminin tanımlanması

1.7.1. Düzenek

Ekipmanların bütün parçaları için kullanılan materyallerin çözme, süzme, adsorplama ya da balık üstünde olumsuz etki yapabilmelerinden kaçınmak için dikkat gösterilmelidir. Kimyasal olarak aktif olmayan ve yükleme hızına uygun kapasitede standart dikdörtgen ya da silindirik tanklar kullanılabilir. Teflon®, paslanmaz çelik yada cam tüpler tercihen kullanılabilir. Plastik tüplerin kullanımı en aza indirilmelidir. Tecrübeler yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip maddeler için sentetik pyrethroitler, silanize (silisyum ile modifiye edilmiş) edilmiş camın gerekebildiğini göstermiştir. Bu hallerde kullanılan ekipman kullandıktan sonra atılmalıdır.

1.7.2. Su

Testte genel olarak kirletilmemiş ve belli kalitede kaynaktan gelen doğal su kullanılır. Seyreltme için kullanılan su seçilen balık türlerinin havalandırma (iklimlendirme) ve test sürelerinde yaşamasına imkân verecek ve herhangi bir anormal görünüm ve davranış yaratmayacak kalitede olmalıdır. İdeal olarak balıkların seyreltme suyunda yaşayabildiği, büyüyebildiği ve çoğalabildiği gösterilmelidir.(örneğin laboratuvar kültürü veya yaşam döngüsü toksisite testi). Su ayrıca en azından pH, sertlik, toplam katı, toplam organik karbon ve tercihen ayrıca amonyum, nitrit, bazlık ve deniz türleri için de tuzluluk açısından karakterize edilmelidir. Balık iyiliği için önemli olan değişkenler tümüyle bilinmektedir ancak Ek- I tatlı ve deniz suyu için önerilen en fazla konsantrasyonları vermektedir.

Su test boyunca sabit kalitede olmalıdır. pH değeri 6.0 ila 8.5 aralığında olmalıdır ancak verilen bir testte ise ±0.5 pH birimi aralığında olmalıdır. Seyreltme suyunun gereksiz olarak test sonuçlarını etkilemeyeceğinden (örneğin test maddesi ile kompleksleşerek) emin olmak için yada balık stoğunun performansını etkilemeyeceğinden emin olmak için aralıklarla analiz için örnek alınmalıdır. Ağır metallerin (örneğin, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) ve temel anyonların ve katyonların (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pestisitlerin (toplam fosfatlı organik pestisit ve klorlu organik pestisit), toplam organik karbonun ve asılı katıların tayini suyun kalitesinin bağıl olarak sabit kalitede olduğu bilinen bir zamanda örneğin 3 ayda yapılmalıdır. Su kalitesinin en azından 1 yıl boyunca sabit kalitede olduğu durumlarda ölçümler daha az sıklıkta ve ölçüm aralıkları uzatılarak(örneğin her altı ayda) yapılabilir.

Seyreltme suyunun doğal tanecik içeriği ve toplam organik karbon içeriği test maddesinin biyo-yararlanımını düşürebilecek olan organik maddeye adsorpsiyonunu engellemek için mümkün olduğu kadar düşük seviyede tutulmalıdır.

En fazla kabul edilen değer 5 mg/L tanecikli madde (kuru ve 0.45 mikronluk filtreden geçmeyen) ve 2 mg/L toplam organik karbondur (EK- I'e bakınız). Gerekli olduğunda su, kullanım öncesi filtre edilmelidir. Test balığından ve yiyecek kalıntılarından suya gelen organik karbon içeriği katkısı mümkün olduğu kadar düşük tutulmalıdır. Test boyunca, test kabındaki organik karbon derişimi test maddesinden kaynaklanan organik karbon derişimini ve eğer kullanılmışsa çözünürleştirici ajanın derişimini 10 mg/L'den fazla geçmemelidir (±%20).

1.7.3. Test Çözeltileri

Test maddesinin uygun derişimde bir stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti test maddesinin basitçe seyreltme suyunda çözüp çalkalayıp karıştırarak hazırlanır. Çözücülerin ve dağıtıcıların (çözünürleştirici ajanlar) kullanımı önerilmez ancak bazı durumlarda uygun ve derişik bir stok çözelti hazırlamak için gerekli olabilir. Kullanılabilen çözücüler etanol, metanol, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetilformamit ve trietilen glikoldür. Kullanılabilen dağıtıcılar Cremephor RH40, Tween 80, % 0.01'lik metilselüloz ve HCO-40'tır. İç-akış testinde bakteri üremesine neden olabilecek kolay bozunabilir ajanları kullanırken dikkatli olunmalıdır. Test maddesi radyoaktif olarak işaretlenebilir ve en yüksek saflıkta olmalıdır(tercihen % 98'den fazla).

İç-akış testleri için, test bölmelerine test derişimlerini uygulamak için, test maddesinin stok çözeltisini sürekli olarak dağıtan bir sisteme(ölçüm pompası, oransal seyreltici, doyurucu sistemi) ihtiyaç vardır. Her bir test bölmesinde günlük olarak en azından 5 hacim değişimi tercihen yapılabilir. İç-akış modu tercih edilmelidir ancak bunun mümkün olmadığı durumda doğruluk ölçütleri sağlandığında yarı durağan bir teknik kullanılabilir. Stok çözeltilerinin ve seyreltme suyunun akış hızı 48 saat önce ve test süresince de en azından günlük olarak kontrol edilmelidir. Bu kontrol her bir test bölmesindeki akış hızının kontrolünü içerir ve bölmelerde ve bölmeler arasında 20% değişmediğinden emin olunur.

1.7.4. Türlerin Seçimi

Türlerin seçimindeki önemli ölçütler, kolaylıkla elde edilebilir olması, uygun boyutta elde edilmesi ve laboratuvarda kolaylıkla saklanabilir olmasıdır. Balık türlerinin seçimindeki diğer lçütler ticari olması, ekolojik önemi, karşılaştırılabilir duyarlılıkta olması ve geçmişte başarılı kullanımıdır. Önerilen test türleri Ek- II'de verilmiştir. Diğer türlerde kullanılabilir ancak test prosedürünü uygun test koşulları oluşturmak için uyarlanması gereklidir. Bu halde türlerin seçimindeki sebep ve deneysel koşullar belirtilmelidir.

1.7.5. Balıkların muhafaza edilmesi

Stok balık popülâsyonu testten önce en az 2 hafta boyunca teste uygulanacak koşullarda beslenir ve su içinde test sıcaklığında havalandırılır.

48 saatlik çökme periyodunu takiben, ölümler kaydedilir ve aşağıdaki ölçütler uygulanır:

- Yedi gün içinde popülasyonun %10 'undan fazla gerçekleşen ölümlerde bütün gruplardaki sonuçlar reddedilir..
- Yedi gün içinde popülasyondaki %5 ve %10 arasındaki ölümlerde yedi ilave gün daha havalandırılır.
- Yedi gün içinde popülasyondaki %5'den az ölümlerde gruplardan elde edilen sonuçlar kabul edilir, eğer ilave yedi günde %5'den fazla ölüm varsa bütün gruplardaki sonuçlar reddedilir..

Testlerde kullanılan balıkların gözlenebilir hastalıklara sahip olmamasına ve anomalite olmadığından emin olunur. Hasta olan balıklar atılır. Balıklar testten 2 hafta önce ya da test esnasında tedavi edilmemiş olmalıdır.

1.8. Testin performansı

1.8.1. Ön test

Açıklayıcı testin; test maddesi konsantrasyonu, alım evreleri, atılım evreleri süresi gibi koşullarını iyileştirmek (optimize etmek) için ön bir testin yürütülmesi yararlı olabilir.

1.8.2. Maruz kalma şartları

1.8.2.1. Alım evresinin süresi

Alım evresinin zamanının tahmini pratik tecrübelerden yada test maddesinin sudaki çözünürlüğü yada oktanol/su dağılım katsayısı bilgileri gibi kesin ampirik ilişkilerden elde edilebilir.(EK- III'e bakınız)

Alım evresi daha önce dengeye gelmiyorsa 28 gün yürütülmelidir. Eğer 28 gün içinde yatışkın hale ulaşılamıyorsa, alım evresi daha fazla ölçüm alarak yatışkın hale ulaşana dek yada 60 güne, hangisi daha kısa ise, uzatılabilir.

1.8.2.2. Atılım evresinin süresi

Alım evresinin süresinin yarısı kadar bir süre vücuttaki maddenin yükünde (örneğin, %95) azalma gerçekleşmesi için genellikle yeterlidir. (Açıklama ve hesaplama için Ek-III'e bakınız). Eğer %95 kayıp için gereken süre pratik olarak çok uzunsa, örneğin normal alım evresini 2 kattan fazla aşıyorsa (56 günden fazla) daha kısa bir periyot kullanılabilir (yani, test maddesinin konsantrasyonu yatışkın-hal konsantrasyonun %10'undan az olana kadar). Ancak birinci derece kinetik oluşturan ve tek bölmeli balık modelinden daha karmaşık alım ve atılım şablonuna sahip maddeler kayıp hızı sabitlerinin hesaplanması için daha uzun atılım evreleri gerektirebilir. Periyot, test maddesinin balıktaki konsantrasyonu analitik tayin sınırının üzerinde kaldığı periyot tarafından kontrol edilebilir.

1.8.2.3. Test Balıklarının Sayısı

Her bir örneklemede örnek başına en az dört balık olacak şekilde her bir konsantrasyonunda balık sayısı belirlenir. Eğer daha fazla istatiksel kuvvet gerekiyorsa örnek başına daha fazla balık gerekebilir.

Eğer deneyde yetişkin balıklar kullanılmışsa dişi mi erkek mi olduğu yada ikisi birden kullanılmışsa rapor edilmelidir. Eğer her iki cinsiyette kullanılmışsa, cinsiyetler arası lipit içeriğinin önemsiz olduğu maruz kalmain başlangıcından önce belgelendirilmelidir. Bunun için erkek ve dişi balıkların biriktirilmesi gerekebilir.

Herhangi bir testte, en küçüğü en büyüğünün üçte ikisinden küçük olmayacak şekilde benzer ağırlıkta balıklar seçilir. Hepsi aynı yılın türünden olmalı ve aynı kaynaktan gelmelidir. Balığın ağırlığı ve yaşı BCF değerlerinde bazen ciddi etkiye sahip olduğu için (1) bu ayrıntılar doğrulukla kaydedilir.. Bunun için testten önce ortalama ağırlığı hesaplayabilmek için balık stoğunun bir alt örneğinin tartılması önerilir.

1.8.2.4. Yükleme

Testin başlangıcında balığın eklenmesinin neden olduğu C_w azalmasını en aza indirmek için ve çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmadan kaçınmak için yüksek su-balık oranları kullanılır. Kullanılan test türleri için yükleme hızının uygun olması önemlidir. Her durumda normal olarak günlük olarak litre su başına 0.1-1.0 g balık düzeyindeki (ıslak ağırlık) yükleme hızı önerilir. Test maddesinin istenen derişiminin ±%20 sınırlarında tutulabildiği ve çözünmüş oksijen derişimininin %60'dan az doygunluğa düşmediği gözleniyorsa daha yüksek yükleme hızları da kullanılabilir.

Uygun yükleme koşullarını seçerken, balık türlerinin normal yaşam çevreleri göz önüne alınır. Örneğin, dipte yaşayan balıklar akvaryumda aynı hacimde su için okyanus dibindeki balıklardan daha fazla dip alanına ihtiyaç duyar.

1.8.2.5. Besleme

İklimlendirme ve test periyodu boyunca, balıklar bilinen lipit ve protein içeriğine sahip ve vücut ağırlıklarını sabit tutacak ve onları sağlıklı tutacak besinler ile beslenir. Balıklar iklimlendirme ve test periyodunda toplam vücut ağırlıklarının %1 ila %2'sine denk gelecek nispette besinle beslenir bu oran test boyunca balıkların lipit içeriğini görece olarak sabit bir değerde tutar. Verilecek besin miktarı, uygun vücut ağırlığını ve lipit içeriğini sağlamak için örneğin haftada bir yeniden hesaplanmalıdır. Bu hesaplama için her bir test bölmesindeki balıkların ağırlığı o bölmeye en son konulan balığın ağırlığından hesaplanabilir. Bölme içindeki balıkların ağırlığı ölçülmez.

Yenilmeyen besinler ve posalar beslemeden (30 dakika veya 1 saat) sonra test bölmelerinden sifonlama ile uzaklaştırılır. Organik madde konsantrasyonunu mümkün olduğu kadar düşük seviyede tutabilmek için bölmeler test boyunca mümkün olduğu kadar temiz tutulur çünkü organik karbonun varlığı test maddesinin biyo yararlanımını sınırlayabilir.

Pek çok besin balıktan elde edildiği için bu besinler test maddesi içeriği için analiz edilmelidir. Ayrıca besinin pestisit ve ağır metal içeriği analizi de istenebilir.

1.8.2.6. Işık ve sıcaklık

Işıklı periyot genellikle 12 ila 16 saattir ve sıcaklık test türleri için uygun olacak sıcaklıkta (±2 ^{o}C 'te) tutulmalıdır (Ek- II'ye bakınız).

Işıklandırmanın türü ve karakteristikleri bilinmelidir. Çalışmadaki ışınlama koşullarında maddenin ışıkla olası ışıkla dönüşümüne karşı dikkat edilmelidir. Balığın doğal olmayan ışınlama sonucu oluşan ürünlere maruz kalmadan kaçınmak için uygun ışıklandırma kullanılmalıdır. Bazı durumlarda 290 nm altındaki UV ışımasını perdelemek için bir filtre kullanılır.

1.8.2.7. Test konsantrasyonları

Balıklar iç-akış şartları altında test maddesinin en az iki farklı konsantrasyonuna maruz bırakılır. Normal olarak, test maddesinin en yüksek konsantrasyonu akut asimptotik LC_{50}'sinin yaklaşık %1'i olacak ve kullanılan analitik yöntemle sudaki tayin sınırının en az 10 katı olacak şekilde seçilir. En yüksek test konsantrasyonu ayrıca 96 saatlik akut LC_{50} değerini uygun bir akut/kronik orana (bazı kimyasallar için uygun oranlar 3'ten 100'e kadar olabilir) bölerek de belirlenebilir. Eğer mümkünse, diğer konsantrasyon ötekinden 10 kat farklı olacak şekilde seçilir. Eğer bu %1'lik LC_{50} ölçütü ve analitik sınır nedeniyle mümkün değilse, 10'dan daha düşük bir oran yada ^{14}C işaretli test maddesi kullanılabilir. Test maddesinin çözünürlüğünün üzerinde hiçbir konsantrasyon kullanılmamalıdır.

Çözünürleştirici bir ajanın kullanılması durumunda konsantrasyonu 0.1 ml/L den daha yüksek olmamalıdır ve bütün test kaplarında aynı olmalıdır. Test maddesi ile birlikte bunun test suyundaki toplam organik karbona olan katkısı bilinmelidir. Ancak bu tür maddelerin kullanımından kaçınmak için bütün çaba sarf edilmelidir.

1.8.2.8. Kontroller

Bir seyreltme suyu veya uygunsa test balıklarına herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmişse çözünürleştirici ajan içeren bir kontrol, test serilerine paralel olarak yürütülmelidir.

1.8.3. Su kalitesi ölçümlerinin sıklığı

Test boyunca bütün kaplarda çözünmüş oksijen, TOC, pH, sıcaklık ölçülmelidir. Uygunsa toplam sertlik ve tuzluluk kontrollerde ve daha yüksek konsantrasyondaki bir kapta ölçülmelidir. Çözünmüş oksijen miktarı ve tuzluluk uygunsa en az 3 kez alım periyodunun başında, ortasına yakın ve sonunda ve haftada bir kez de atılım periyodunda ölçülmelidir.

TOC testin başında (alım evresi testinin başlangıcından 24 ila 48 saat önce) balıklar eklenmeden önce ve alım ve atılım evrelerinin ikisinde de haftada en az bir kez ölçülmelidir. Sıcaklık günlük olarak, pH her bir periyodun başında ve sonunda ve sertlik her teste ölçülmelidir. Sıcaklık tercihen en az bir test kabında sürekli olarak izlenmelidir.

1.8.4. Su ve balıkların örneklenmesi ve analizi

1.8.4.1. Su ve balık toplama takvimi

Test maddesi derişiminin belirlenmesi için test bölmelerinden su örneği alımı balıkların eklenmesinden önce ve hem alım hem de atılım evrelerinde yapılır. En az olarak, su ve balığın örneklemesi aynı zamanda, balığın beslemesinden önce alınır. Alım evresinde, test maddesinin konsantrasyonu doğruluk ölçütleri ile uyumluluğun kontrolü için belirlenir.
Balıklar alım evresinde en az 5 farklı ortamdan ve atılım evresinde ise en az 4 farklı ortamdan toplanır. Bazı ortamlarda özellikle basit birinci derece atılım kinetiğinden başka kinetik

gösterdiğinde, BCF değerinin kabul edilebilir bir hesaplamasının yapılması zor olduğu için, daha yüksek sıklıkta örnekleme yapılması uygun olabilir.(Ek-IV'e bakınız). Toplanan ilave örnekler, eğer ilk kesimdeki analizler BCF'nin istenen doğrulukta hesaplanması için uygun değilse saklanır ve analiz edilir.

Kabul edilebilir bir örnekleme şablonu Ek-IV'te verilmiştir. Diğer şablonlar %95 alımdaki maruz kalma zamanını hesaplamak için diğer varsayılan P_{ow} değerlerini kullanarak kolaylıkla hesaplanabilir.

Örneklemeye alım evresinde 28 gün yada yatışkın bir hal oluşuncaya kadar, bunlardan hangisi daha kısa ise, devam edilir. Eğer yatışkın hale 28 günden ulaşılamıyorsa örneklemeye yatışkın bir hal oluşuncaya kadar ya da 60 gün, bunlardan hangisi daha kısa ise, devam edilir. Atılım evresinin başlangıcından önce balıklar temiz bir tanka alınır.

1.8.4.2. Örnekleme ve örnek hazırlama

Su örnekleri test bölmesindeki merkezi bir noktadan etkinlik göstermeyen bir tüpe sifonlamayla alınarak analiz edilir. Filtreleme ve santrifüjlemeden hiçbiri biyo yararlanılabilir olamayan kesiminin biyolojik yararlanılabilir kesimden ayrılmasını sağlamadığı için(özellikle P_{ow} değerleri 5'ten büyük olan yüksek oranda yağ seven kimyasallar için) (1)(5) örnekler bu tür işlemlere tabi tutulmayabilir.

Bunun yerine kapları mümkün olduğu kadar temiz tutacak önlemler alınır ve toplam organik karbon içeriği hem alım hem de atılım evrelerinde izlenir.

Uygun sayıda balık (normal olarak en az 4) her örnekleme zamanında test bölmelerinden ayrılır. Alınan balıklar tatlı suyla hızlıca yıkanır, kurulanır ve en uygun ve insani yolla öldürülür ve tartılır.

Bozunma ve diğer kayıpları engellemek için ve test süresince uygun alım ve atılım hızlarını yaklaşık olarak hesaplayabilmek için örneklemeden hemen sonra balıkların ve suyun analiz edilmesi tercih edilir. Hemen analiz ayrıca plato değerinin belirlenmesindeki gecikmeleri de engeller.

Eğer hemen analiz yapılmazsa, örnekler uygun bir yöntem ile saklanır. Çalışmanın başlangıcından önce, belirli bir test maddesinin saklanması ile ilgili uygun bir yöntem, örneğin derin dondurma, 4°C'de tutma, saklama zamanı, ekstraksiyon gibi bilgiler elde edilmelidir.

1.8.4.3. Analitik yöntemin kalitesi

Bütün yöntem analitik yöntemin doğruluk, kesinlik ve duyarlılığına dayandığı için, kimyasal analizin kesinliği, tekrarlanabilirliği ve belli bir yöntem için test maddesinin hem sudan hem de balıktan kayda değer şekilde geri kazanılabilirliği kontrol edilir. Ayrıca test maddesinin kullanılan seyreltme suyunda tayinedilebilir olmadığı kontrol edilir.
Eğer gerekiyorsa, testten elde edilen C_w ve C_f değerleri kontrollerin geri kazanım ve zemin değerlerine göre düzeltilir. Balık ve su örnekleri kirlilik ve kayıp olmayacak şekilde muhafaza edilir. (ölçüm cihazına adsorpsiyondan kaynaklanan)

1.8.4.4. Balık örneğinin analizi

Eğer testte radyoaktif işaretli malzemeler kullanılacaksa, toplam radyoaktif işaretleyici (ana bileşik ve metabolitler) için analiz yapılabilir ya da örnekler ana bileşik ayrı olarak analiz edilebilecek şekilde temizlenir. Ayrıca, temel metabolitler yatışkın halde ya da testin alım evresi sonunda, hangisi önce gerçekleşiyorsa, karakterize edilebilir. Eğer BCF radyoaktif işaretli kalıntılar cinsinden ≥1000% ise, bazı önemli kimyasalları ki bunlar arasında pestisitler güçlü bir şekilde önerilir, yatışkın halde balık dokularındaki toplam kalıntıların %10'undan fazlasını temsil eden bozunmanın tanımlanması ve miktarının belirlenmesi önerilir. Eğer balık dokularındaki radyoaktif işaretli artıkların %10'undan fazlasını temsil eden bozunma tanımlanır ve miktarı belirlenirse, bu bozunmanın test suyunda da tanımlanması ve miktarının belirlemesi önerilir.

Test maddesinin konsantrasyonu genel olarak tartılan her bir balık için belirlenmelidir. Eğer bu mümkün değilse, her bir örneklemede balıklar biriktirilebilir ancak biriktirme verilere uygulanabilecek olan istatistikî işlemleri kısıtlar. Eğer belirli bir istatistiki işlem ve kuvvet önemli bir sebep ise, o zaman uygun sayıda balık istenen biriktirme prosedürüne ve kuvvete uygun şekilde dahil edilir.(6)(7)

BCF toplam ıslak ağırlık olarak ve yüksek yağ seven maddeler için toplam lipit içeriğinin fonksiyonu olarak tanımlanmalıdır. Balığın lipit içeriği eğer mümkünse her bir örnekleme alanında belirlenir. Lipit içeriğinin belirlemesi için uygun yöntemler kullanılmalıdır.(EK-III'teki Ref.2 ve 8)

Kloroform/metanol ekstraksiyon tekniği standart bir yöntem olarak önerilebilir.(9) Farklı yöntemiler aynı sonucu vermez(10) bu yüzden kullanılan metodun ayrıntılarının verilmesi gerekir. Mümkün olduğunda, lipitin analizi test maddesinin analizi için üretilen aynı ekstrakt ile yapılmalıdır. Çünkü lipitlerin kromatografik olarak analiz edilmeden önce uzaklaştırılmaları gerekir. Deneyin sonunda balığın lipit içeriği (mg/ kg ıslak ağırlık) deneyin başlangıcındaki değerden ±%25'ten fazla değişmemelidir. Islak temele dayalı lipit konsantrasyonunu kuru temele dayalı konsantrasyona dönüştürmek için doku katı yüzdesi rapor edilmelidir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Test maddesinin alım eğrisi alım evresinde balıktaki (veya ilgili dokudaki) konsantrasyonunun zamana karşı aritmetik ölçekte çizilmesiyle elde edilir. Eğer eğri bir plato değerine ulaşmışsa, yani zaman eksenine asimptotik hale gelmişse, yatışkın hal BCF_{ss} aşağıdaki eşitlikten hesaplanır:

$$\frac{C_f yatışkın\ hal\ olarak\ (ortalama)}{C_w yatışkın\ hal\ olarak\ (ortalama)}$$

Yatışkın hale ulaşılamadığında, BCF_{ss} değerini zarar değerlendirmesi yeterli doğrulukta %80 yatışkın halde ($1.6/k_2$) yada dengenin %95'inde ($3.0/k_2$) hesaplamak mümkündür.

Ayrıca konsantrasyon faktörü (BCF_K) iki birinci derece hız sabitinin oranından k_1/k_2 belirlenir. Atılım hız sabiti(k_2) genel olarak atılım eğrisinden hesaplanır (Test maddesinin

konsantrasyonunun balıktaki azalmasının zamanla değişimi). Alım hız sabiti (k_1) verilen k_2 ve alım eğrisinden türetilen C_f değerinden hesaplanır. BCF_k değerini ve hız sabitlerini, k_1 ve k_2, elde etmenin yolu bilgisayardan doğrusal olmayan parametre elde etme yöntemleri kullanmaktır (11). Aksi taktirde, k_1 ve k_2 'nin hesaplanmasında grafiksel yöntemler kullanılır. Eğer atılım eğrisi birinci derece değilse bu durumda daha karmaşık modeller kullanılmalıdır (bakınız Ek- III) ve bir biyo-istatistikçiden yardım alınır.

2.2. Sonuçların yorumlanması

Sonuçlar, ölçülen konsantrasyonlar analitik yöntemin tayin sınırlarına yakın seviyelerde gerçekleşiyorsa dikkatle yorumlanmalıdır.

Açıkça tanımlanmış alım ve azalma eğrileri iyi biyolojik konsantrasyon verilerinin gerçekleştiğini gösterir. İki test derişimi arasında alım/atılım hızları arasında gözlemlenen değişimler 20%'den az olmalıdır. İki test derişimi arasında gözlenen farklılıklar kaydedilmeli ve muhtemel nedenleri açıklanmalıdır. Genel olarak iyi tasarlanmış çalışmalar BCFs için güven aralığı ±20%'ye yaklaşır.

3. RAPORLAMA

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir.

3.1. Test maddesi

- Fiziksel özellikler ve ilgili olduğunda fizikokimyasal özellikler
- Kimyasal tanımlama verisi (varsa organik karbon içeriğini de kapsayan)
- Eğer radyoaktif işaretli ise, işaretli atomun kesin yeri ve safsızlıklardan kaynaklanan radyoaktivite yüzdesi

3.2. Test türleri

- Bilimsel adı, ırk, kaynak, herhangi bir ön muamele yapılıp yapılmadığı, iklimlendirme, yaş, büyüklük aralığı

3.3. Test koşulları

- Kullanılan test işlemi (iç-akış yada yarı durağan)
- Kullanılan ışıklandırmanın tür ve karakteristiği ve ışıklandırma periyodu
- Test tasarımı (örneğin test bölmelerinin sayısı ve büyüklüğü, su hacmi değiştirme hızı, tekrar sayısı, tekrar başına balık sayısı, test konsantrasyonlarının sayısı, alım ve atılım evrelerinin uzunluğu, balık ve su örnekleme sıklığı)
- Stok çözeltilerin hazırlanma yöntemi ve yenileme sıklığı (çözünürleştirici ajan konsantrasyonu, test suyunun organik karbon içeriğine olan katkısı kullanıldığında verilmelidir)
- Nominal test konsantrasyonları, ölçülen değerlerin ortalaması ve test kaplarındaki standart sapması ve bunun hesaplandığı yöntem
- Seyreltme suyunun kaynağı, herhangi bir ön muamelenin açıklaması, test balığının seyreltme suyunda yaşayabildiğinin herhangi bir göstergesi ve su karakteristikleri: pH,

sertlik, sıcaklık, çözünmüş oksijen konsantrasyonu, kalıntı klor seviyesi (eğer ölçüldüyse), toplam organik karbon, asılı katılar, test ortamının tuzluluğu ve yapılan diğer ölçümler

- Test kaplarındaki su kalitesi, pH, sertlik, TOC toplam organik karbon), sıcaklık ve çözünmüş oksijen derişimi
- Besleme hakkında ayrıntılı bilgi (besinin türü, kaynağı, bileşimi-en azından mümkünse lipit ve protein içeriği, verilen miktar ve sıklığı)
- Su ve balık örneklerinin hazırlama koşullarını da içeren muamele edilme koşulları, saklama, ekstraksiyon ve test maddesi için analitik işlemler ve ölçüldüyse lipit içeriği

3.4. Sonuçlar:

- Yürütülen ön çalışmanın sonuçları
- Kontrol ve her bir maruz kalma bölmesindeki balıklarının ölüm oranı ve gözlenen herhangi bir anormal davranış
- Balığın lipit içeriği
- Test kimyasalının balıktaki tutunma ve atılımsını ve yatışkın hale geldiği zamanı gösteren eğriler (ölçülen bütün verileri içeren)
- Bütün örnekleme zamanlarında Cf ve Cw (standart sapma ve aralığı ile birlikte) değerleri(Cf µg/g olarak tüm vücudun yada belli dokuların ıslak ağırlığı (ppm) olarak ifade edilir ve Cw değeri de µg/ml olarak ifade edilir. Kontroldeki Cw değerleri (zemin değeri de belirtilmelidir.)
- Yatışkın hal biyolojik konsantrasyon faktörü (BCFss) ve/veya kinetik konsantrasyon faktörü BCFk ve eğer uygulanabilirse, 95% güven aralığında alım ve atılım için hız sabitleri (bütün hepsi hayvanın tüm vücudunun ya da bir dokusunun toplam lipit içeriği ile ilişkilendirilir.), standart sapma (eğer varsa) ve her bir derişimde kullanılan test maddesi için hesaplama/veri analiz yöntemleri
- Radyoaktif işaretli maddeler kullanıldığında, saptanan herhangi bir metabolitin birikimi
- Testle ilgili olağan olmayan her şey, bu prosedürlerden herhangi bir sapma ve diğer ilgili bilgiler

Sonuçlar test öncesi yöntem geliştirmesi ve deneysel tasarım ile "sonuçlar tayin sınırında saptanmadı" şeklinde en aza indirilir çünkü bu tür sonuçlar hız sabiti hesaplamaları için kullanılamaz.

4. KAYNAKLAR

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev.Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 117-156.

(2) Bintein S. Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on noctanol/ 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 Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
(6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
(7) US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
(8) Compaan H. (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the
(9) Hague, The Netherlands.
(10) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.
(11) 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, pp 1431-1436.
(12) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
(13) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

Ek-I

Seyreltme suyunun kabul edilebilir kimyasal özellikleri

	MADDE	SINIR DERİŞİMİ
1	Partikül madde	5 mg/L
2	Toplam organik karbon	2 mg/L
3	İyonlaşmamış amonyak	1 µg/L
4	Kalıntı klor	10 µg/L
5	Toplam fosforlu organik pestisit	50 ng/L
6	Toplam klorlu organik pestisit artı poliklorlu bi feniller	50 ng/L
7	Toplam organik klor	25 ng/L
8	Aluminyum	1 µg/L
9	Arsenik	1 µg/L
10	Krom	1 µg/L
11	Kobalt	1 µg/L
12	Bakır	1 µg/L
13	Demir	1 µg/L
14	Kurşun	1 µg/L
15	Nikel	1 µg/L
16	Çinko	1 µg/L
17	Kadmiyum	100 ng/L
18	Civa	100 ng/L
19	Gümüş	100 ng/L

Ek-II

Test için önerilen balık türleri

	Önerilen türler	Önerilen test sıcaklık aralığı (°C)	Test hayvanın Önerilen boyu(cm)
1	**Danio rerio**(1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra - balığı	20 - 25	3.0 ± 0.5
2	**Pimephales promelas** (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) İribaş golyan balığı	20 - 25	5.0 ± 2.0
3	**Cyprinus carpio** (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) bayağı sazan	20 - 25	5.0 ± 3.0
4	**Oryzias latipes** (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Pirinç balığı	20 - 25	4.0 ± 1.0
5	**Poecilia reticulata** (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) lepistes	20 - 25	3.0 ± 1.0
6	**Lepomis macrochirus** (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Çapak balığı	20 - 25	5.0 ± 2.0
7	**Oncorhynchus mykiss** (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) gökkuşağı alabalığı	13 - 17	8.0 ± 4.0
8	**Gasterosteus aculeatus** (Teleostei,Gasterosteidae) (Linnaeus) üç çizgili dikenli balık stickleback	18 - 20	3.0 ± 1.0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

Farklı ülkelerde çeşitli nehir ağzında ve denizde yaşayan türleri kullanılmıştır. Örneğin:

Benek.....*Leiostomus xanthurus*
Aptal golyanbalığı.....*Cyprinodon variegatus*
Gümüş sırt.....*Menidia beryllina*
Tatlısu levreği.....*Cymatogaster aggregata*
İngiliz dil balığı.....*Parophrys vetulus*
Geyik balığı .....*Leptocottus armatus*
Üçlü tatlısu balığı.....*Gasterosteus aculeatus*
Deniz levreği.....*Dicentracus labrax*
Tatlısusardalyası.....*Alburnus alburnus*

TOPLAMA

Yukarıdaki tabloda listelenen tatlı su balıkları büyütmesi kolay ve yıl boyunca bolca bulunabilenlerdir. Ancak bazı nehir ağzı ve deniz türleri kısmi olarak ilgili ülkelerle sınırlı kalmıştır. Bu türler balık çiftliklerinde ve laboratuvarda hastalık kontrollü ve parazit kontrollü şartlarda hayvanın sağlıklı kalmasını ve soyunun bilinmesine elverişli olan koşullarda bakılıp işlenebilir. Bu balıklar dünyanın pek çok bölgesinde mevcuttur.

Ek- III

Alım ve atılım evrelerinin sürelerinin tahmini

1 Alım evresinin zamanının tahmini

Testi gerçekleştirmeden önce, k_2'nin kestirimi ve dolayısıyla yatışkın hale ulaşmak için gereken zamanın bir kısım yüzdesi k_2 ve n-oktanol/su dağılım katsayısı (P_{ow}) yada k_2 ve sudaki çözünürlük arasındaki ilişkiden elde edilebilir.

k_2'nin yaklaşık değeri (gün^{-1}) örnek olarak aşağıdaki ampirik ilişkiden elde edilebilir.

$$\log_{10} k_2 = - 0.414 \log_{10}(P_{ow}) + 1.47 (r^2=0.95)$$

(Eşitlik 1)

Diğer ilişkiler için referans 2'ye bakınız.

Eğer dağılım katsayısı (P_{ow}) bilinmiyorsa, maddenin sudaki çözünürlüğü hakkındaki bilgi (3)

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0.862 \log_{10}(s) + 0.710 \ (r^2 = 0.994)$$

kullanılarak bir kestirim yapılabilir.
(Eşitlik 2)

burada s= çözünürlük (mol/L) : (n=36)

Bu ilişkiler yalnızca P_{ow} değerleri 2 ve 6.5 arasında değişen kimyasallara uygulanabilir (4)

Yatışkın halin belli bir yüzdesine ulaşmak için geçen süre alım ve atılımı tanımlayan genel kinetik denklemle(birinci derece kinetik) k_2 kestirimini uygulanarak elde edilebilir.

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 . c_w - k_2 . c_f$$

veya C_w sabitse:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} . c_w (1 - e^{-k_2 t})$$ eşitlik (3)

yatışkın hale ulaşıldığında ($t>\infty$) eşitlik 3 (5) ya da (6)'ya dönüşebilir:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} . C_w$$ yada $C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$

Sonra $k_1/k_2 . C_w$ yatışkın halde balıktaki derişimi bulmak için uygun bir yaklaşımdır($C_{f,s}$). Eşitlik 3 aşağıdaki gibi yeniden yazılabilir.

$$C_f = C_{fs} (1-e^{-k_2 t}) \quad \text{yada} \quad \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{eşitlik (4)}$$

Eşitlik 4 uygulanarak yatışkın halin belli bir yüzdesine ulaşmak için geçen süre k_2 eşitlik 1 veya 2'den tahmin edilebilir.

Rehber olarak, istatistiksel olarak kabul edilebilir veriler (BCF_k) üretmek için istatistiksel en uygun alım zamanı test maddesinin balıktaki konsantrasyonunun logaritmasının zamana karşı değişim eğrisinin yarı noktaya ulaştığı yada, $1.6/k_2$, yada yatışkın halin %80'nine ulaştığı ancak $3.0/k_2$ yada yatışkın halin %95'ni geçmediği zamandır.(7)

Yatışkın halin %80'nine varmak için geçmesi gereken zaman (eşitlik 4)

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{ya da} \quad t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad \textit{eşitlik (5)}$$

benzer şekilde yatışkın halin %95'ine varmak için geçmesi gereken zaman.

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2} \quad \textit{eşitlik (6)}$$

Örneğin, log P_{ow}= 4 olantest maddesi için alım evresinin zamanı (üst) (eşitlik 1, 5, 6 kullanarak)

$\log_{10} k_2 = -0.414.(4) + 1.47$ $\quad k_2 = 0.652$ gün^{-1}

yada

üst (80%) = 1.6 / 0.652 ...2.45 gün(59 saat)

üst (95%) = 3.0 / 0.652 ...4.60 gün (110 saat)

veya

benzer şekilde s= 10^{-5} mol/l(log(s)=-5.0) olan test maddesi için zaman (üst) (eşitlik 1, 2, 5, 6 kullanarak)

$\log_{10} (P_{ow}) = - 0.862 (-5.0) + 0.710 = 5.02$

$\log_{10} K_2 = - 0.414 (5.02) + 1.47$

$k_2 = 0.246$ gün^{-1}

üst (80%) = 1.6 / 0.246 ...6.5 gün(156 saat)

üst (95%) = 3.0 / 0.246 ...12.2 gün (293 saat)

alternatif olarak

$$t_{eq} = 6{,}54 \times 10^3 P_{ow} + 55{,}31 \text{ (hours)}$$

eşitliği etkin yatışkın hal zamanını bulmak için kullanılabilir.(4)

2 Atılım evresinin zamanının tahmini

Vücut yükünü azaltmak yada başlangıç derişiminin belirli bir yüzdesine ulaşmak için geçen süre alım ve atılımı tanımlayan genel kinetik denklemle(birinci derece kinetik) elde edilebilir.(1)(8)
Atılım evresi için C_w sıfır kabul edilir. Eşitlik aşağıdakine dönüşebilir:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \qquad \text{ya da} \qquad C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

$C_{f,0}$,atılımın başlangıcındaki konsantrasyonun, %50 atılıma ulaşmak için gereken zaman t_{50}:

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \qquad \text{veya} \qquad t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

benzer şekilde %95 atılıma varmak için geçen süre

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$ ile hesaplanır.

Eğer %80 alım ilk periyotta kullanılıyorsa ($1{,}6/k_2$) ve %95 kayıp atılım evresinde gözleniyorsa ($3.0/k_2$), atılım evresi alım evresindeki zamanın iki katıdır.

Hesaplamaların alım ve atılım evresinin birinci derece kinetik izlediği varsayımına göre yapıldığı not edilmelidir. Eğer birinci derece kinetiğe açıklıkla uyulmuyorsa, daha karmaşık modeller kullanılabilir. (ref (1))

KAYNAKLAR

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. **1**, pp 309-320.
(2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp 4-10.
(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.
(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.
(6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.
(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19.

Ek-IV

$\log p_{ow}$=4 olan maddelerin biyolojik konsantrasyon testleri için örnekleme şablonunun teorik örneği

Balık örnekleme	Örnek zaman şablonu		Su örneği sayısı	Örnekteki balık sayısı
	Gereken en az sıklık (gün)	İlave örnekleme		
Alım evresi	-1 0		2* 2	45-80 balık ekle
1.	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
2.	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
3.	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
4.	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
5.	4.7		2	6
Atılım evresi				Test kimyasalı içermeyen suya balık nakli
6.	5.0	5.3		4 (4)
7.	5.9	7.0		4 (4)
8.	9.3	11.2		4 (4)
9.	14.0	17.5		6 (4)

- **Minimum 3 kap hacmi kadar su eklendikten sonraki su örneği**

Parantez içindeki sayılar eğer ilave balık örneklemesi yapılacaksa gerekli olan sayılardır.

Not: log P_{ow} 4.0için k_2'nin ön belirlemesi 0.652 $gün^{-1}$'dir. Deneyin toplam süresi 3xüst örneğin 3x4.6 gün =14 güne ayarlanmıştır. "Üst"ün anlamı için Ek -III'e bakınız.

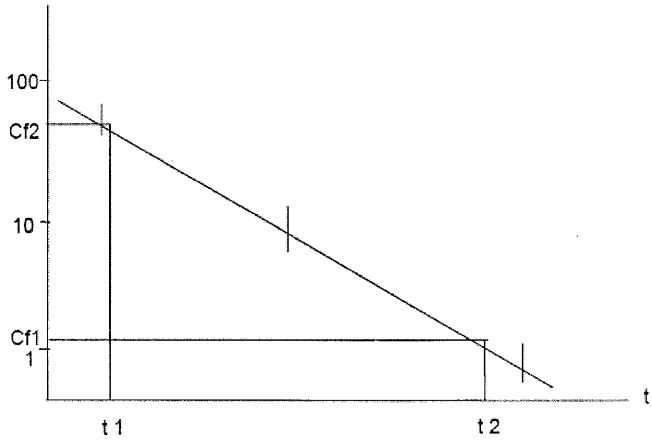
MODEL AYIRIMI

Pek çok biyolojik konsantrasyon verisi yarı logaritmik kâğıda çizildiğinde atılım evresi için balıktaki konsantrasyonları noktalara yaklaşan doğrusal grafikten anlaşıldığı üzere iki bölmeli/ iki değişkenli model ile oldukça kabul edilebilir varsayılır. (bu noktalar daha karmaşık modeller kullanıldığında doğrusal bir grafik ile ifade edilemez, bakınız Spacie and Hamelink, Ref 1, EK-III)

ATILIM HIZ SABİTİ k_2 'Yİ BELİRLEMEK İÇİN GRAFİKSEL YÖNTEM

Her bir balık örneğinde bulunan test maddesi konsantrasyonu örnekleme zamanına karşı yarı logaritmik kağıtta grafiğe geçirilir. Bu doğrunun eğimi k_2 'dir.

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Bu grafikten sapmalar birinci derece kinetikten daha karmaşık atılım eğilimine işaret eder. Grafiksel yöntem birinci derece kinetikten sapan atılım modellerini ayırt etmede kullanılır.

ALIM HIZ SABİTİ k_1' İ BELİRLEMEK İÇİN GRAFİKSEL YÖNTEM

k_2 verildiğinde k_1 aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \textit{eşitlik(1)}$$

C_f değeri derişimin logaritması zamana karşı grafiğe geçirildiğinde düzgün değişen tutunma eğrisinin orta noktasından okunur.(aritmetik ölçekte)

ALIM HIZ SABİTİ ve ATILIM (KAYIP) HIZ SABİTİNİN HESAPLANMASINDAKİ BİLGİSAYAR YÖNTEMİ

Biyolojik konsantrasyon faktörü ve k_1 ve k_2 hız sabitlerini elde etmek için tercih edilen yol bilgisayar ile doğrusal olmayan değişken hesabıdır. Bu programlar k_1 ve k_2 değerlerini dizisel zaman-konsantrasyon verilerine ve

Eşitlik 2

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c$$

Eşitlik 3

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t} \right) \quad t > t_c$$

Modeline göre bulur.

Burada t_c= alım evresi sonundaki zamandır.

Bu yaklaşım k_1 ve k_2'nin standart sapmalarını hesaplamaya da olanak sağlar.

k_2 pek çok durumda oldukça yüksek kesinlikle atılım eğrisinden hesaplanabilir ve k_1 ve k_2 aynı anda hesaplandıklarında aralarında güçlü bir bağlılaşım olduğundan önce sadece atılım verilerinden k_2'nin hesaplanması sonra da doğrusal olmayan regresyon analizi ile alım verilerinden k_1'nin hesaplanması önerilir.

C.14 YAVRU BALIK BÜYÜME TESTİ

1. YÖNTEM

Bu büyüme toksisite testi OECD TG 215 (2000) yöntemi ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu test yavru balıkların büyümesine, kimyasallara uzun süre maruz kalmalarının etkilerini belirlemek için tasarlanmıştır. Bu test iç akış koşullarında yavru gökkuşağı alabalığının *(Oncorynchus mykiss)* büyümesine kimyasalların etkisini belirlemek için geliştirilen ve halka-testi (1) (2) yöntemine dayanmaktadır. Diğer iyi belgelenmiş türlerde kullanılabilir. Örneğin, zebra balığı (*Danio rerio*)[1] (3)(4) ve pirinç balığı türlerinin (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7) büyümesi ile ilgili tecrübeler vardır.

Ayrıca bkz Genel giriş bölüm C.

1.2. Tanımlar ve birimler

Olumsuz etki gözlemlenen en düşük konsantrasyon (LOEC): Test maddesinin kontrolle karşılaştırıldığında kayda değer bir etki gösterdiği ($p<0.05$) en düşük test derişimidir. Ancak LOEC'nin üzerindeki bütün test derişimleri LOEC'de gözlemlenene eşit yada daha fazla zararlı etkiye sahip olmalıdır.

Etki gözlemlenmeyen konsantrasyon (NOEC): Test maddesinin LOEC değerinin hemen altındaki derişimdir.

ECx: Kontrol ile kıyaslandığında balıkların büyüme hızında %x değişime yol açan test maddesinin derişimidir.

Yükleme hızı: Suyun hacmi başına düşen ıslak balık ağırlığıdır.

Depolama yoğunluğu: Suyun hacmi başına düşen balık sayısı.

Tek bir balığın büyüme hızı: Tek bir balığın başlangıç ağırlığına dayanan büyüme hızını tanımlar.

Depo ortalamasına özgül büyüme hızı: Belli bir derişimde depo popülasyonundaki ortalama büyüme hızını tanımlar.

Yalancı-özgül büyüme hızı: Depo popülasyonundaki ortalama ilk ağırlıklarına kıyasla bir balığın büyüme hızını tanımlar.

---

[1]Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Üstel büyüme evresindeki yavru balık tartıldıktan sonra test bölmelerine yerleştirilir ve ölümcül derişimin altındaki derişim aralıklarında suda çözünmüş test maddelerine, tercihen iç-akış modunda eğer mümkün değilse, uygun yarı-durağan koşullarda maruz bırakılır. Test süresi 28 gündür. Balıklar günlük olarak beslenir. Yiyecek payı balığın başlangıçtaki ağırlığına bağlıdır ve 14 gün sonra tekrar hesaplanabilir. Testin sonunda balıklar tekrar tartılır. Büyüme hızında %x değişime, ECx (örneğin EC_{10}, EC_{20}, veya EC_{30}), yol açacak derişimi hesaplamak için büyüme hızına olan etkiler bir regresyon metodu ile analiz edilir.

Alternatif olarak, LOEC veya NOEC değerlerini belirlemek için veriler kontrol değerleri ile karşılaştırılabilir.

1.4. Test maddesi hakkında bilgi

Bu test için seçilen test türleri ile yürütülen akut toksisite testinin (bakınız Test Yöntemi C.1) sonuçları mevcut olmalıdır. Bu sudaki çözünürlük, buhar basıncının bilinmesini ve test çözeltilerindeki maddenin miktar tayini için güvenilebilir, rapor edilen doğrulukta ve tayin sınırında bir analitik yöntemin var olmasını içerir.
Kullanışlı olabilecek bilgiler, yapısal formül, maddenin saflığı, sudaki ve ışıktaki kararlılık, pK_a, P_{ow} ve hazır biyolojik bozunma için testin sonuçlarıdır.

1.5. Test yönteminin geçerliliği

Testin geçerli olabilmesi için aşağıdaki koşullar sağlanmalıdır:

- Testin sonunda kontrol(ler) deki ölüm oranı %10'u geçmemelidir.
- Kontroldeki ortalama balık ağırlığı kayda değer olan büyüme hızındaki en az değişmeyi belirleyebilecek orana yükseltilmelidir. Gökkuşağı alabalığı için halka testi(2) kontroldeki ortalama balık ağırlıklarının 28 gün boyunca en az yarısı kadar (% 50) artması gerektiğini göstermiştir. Örneğin başlangıçta: 1g/balık(=100%), 28 gün sonra son ağırlık:>1.5 g/balık(<%150)
- Test süresince çözünmüş oksijenin derişimi, hava doygunluk değerinin (ASV) en az %60'ı olmalıdır.
- Test süresince ölçüm bölmeleri arasındaki su sıcaklığı ±1 °C'den fazla değişmemelidir ve test türleri için belirlenen sıcaklık aralığında 2 °C değişim aralığında tutulmalıdır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Düzenek

Normal laboratuar ekipmanı ve özellikle aşağıdakiler bulunmalıdır:
- Oksijen ve pH metre
- Su sertliğinin ve bazlığının tayini için ekipman
- Sıcaklık kontrolü için ve tercihen sürekli izleme sağlayacak uygun düzenek
- Kimyasal olarak aktif olmayan malzemeden yapılan yükleme ve depolama yoğunluğu için tavsiye edilen uygun kapasitede tanklar
- Uygun doğrulukta terazi(doğruluk ±0.5%)

1.6.2. Su

Test türlerinin uzun süre yaşayabildiği ve büyüyebildiği herhangi bir su test suyu olarak kullanılabilir. Su test boyunca sabit kalitede olmalıdır. Suyun pH değeri 6 ila 8.5 aralığında olmalıdır, ancak verilen bir testte ise ±0.5 pH birimi aralığında olmalıdır. 140 mg/L ($CaCO_3$ olarak) üzerinde sertlik tavsiye edilir. Seyreltme suyunun gereksiz olarak test sonuçlarını etkileyemeyeceğinden (örneğin test maddesi ile kompleksleşerek) emin olmak için aralıklarla analiz için örnek alınmalıdır. Ağır metallerin (örn, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) ve temel anyonların ve katyonların (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pestisitlerin (toplam fosfatlı organik pestisit ve klorlu organik pestisit), toplam organik karbonun ve asılı katıların tayini suyun kalitesinin bağıl olarak sabit kalitede kaldığı bilinen bir zamanda örneğin 3 ayda yapılmalıdır. Su kalitesinin en azından 1 yıl boyunca sabit kalitede olduğu durumlarda ölçümler daha az sıklıkta ve ölçüm aralıkları (her 6 ayda) uzatılarak yapılabilir.

Ek -II de seyreltme suyu için kabul edilebilen kimyasal karakteristikleri listelemektedir.

1.6.3. Test çözeltileri

Test maddesinin seçilen derişimlerdeki çözeltileri stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanır. Stok çözelti test maddesini uygun mekanik araçlarla (karıştırıcı, ultrasonikasyon) seyreltme suyunda basitçe çözüp, çalkalayıp, karıştırarak hazırlanır. Uygun derişik stok çözelti elde etmek için doyurma kolonları (çözünürlük kolonları) kullanılabilir.
Çözücülerin ve dağıtıcıların (çözünürleştirici ajanlar) kullanımı bazı durumlarda uygun ve derişik bir stok çözelti hazırlamak için gerekli olabilir. Kullanılabilen çözücüler aseton, etanol, metanol, dimetilsülfoksit, dimetilformamit ve trietilen glikoldür. Kullanılabilen dağıtıcılar Cremephor RH-40, Tween 80, %0.01'lik metilselüloz ve HCO-40'tır. İç akış testinde bakteri üremesine neden olabilecek kolaylıkla bozunabilir (örn. aseton) ajanlar ve/veya çok uçucu bileşikler kullanırken dikkatli olunmalıdır. Çözünürleştirici ajan kullanıldığında, balık büyümesine yada yavru balıklara çözücü kontrolü ile açığa çıkan gözle görülebilir bir olumsuz etkisi olmamalıdır.

İç akış testleri için, test bölmelerine test derişimlerini uygulamak için, test maddesinin stok çözeltisini sürekli olarak dağıtan bir sisteme (ölçüm pompası, oransal seyreltici, doyurucu sistemi) ihtiyaç vardır. Stok çözeltilerinin ve seyreltme suyunun akış hızı test süresince aralıklarla ve tercihen en azından günlük olarak kontrol edilmelidir ve test boyunca 10%'dan fazla değişmemelidir.

Yarı-durağan testler için (yenileme testleri), ortam yenilemesinin sıklığı test maddesinin kararlılığına bağlıdır ancak günlük su değişimi önerilir. Eğer ilk kararlılık testlerinden (bkz bölüm1.4), yenileme periyodu süresince test maddesi derişimi kararlı değilse (nominal değerin %80-%120'si yada ölçülen başlangıç derişiminin 80%'sine düşüyorsa), iç akış testi kullanırken dikkat edilmelidir.

1.6.4. Türlerin seçimi

Bu testte yavru gökkuşağı alabalığı *(Oncorynchus mykiss)* halka-testi ile en çok tecrübe bu türden elde edildiği için önerilen türdür (1)(2). Diğer iyi belgelenmiş türlerde kullanılabilir ancak bu durumda test yöntemi uygun test şartlarını sağlamak için bu türler için

uyarlanmalıdır. Örneğin, zebra balığı (*Danio rerio*) (3)(4) ve pirinç balığı türlerinin (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7) büyümesi ile ilgili tecrübeler vardır. Bu durumda türlerin seçimindeki sebep ve deneysel yöntem belirtilmelidir.

1.6.5. Balıkların muhafaza edilmesi

Test balıkları tek depodan ve tercihen aynı yumurtadan çıkmış ve test şartlarında ve testteki ışıklandırma şartlarında testten önce en az 2 hafta tutulmuş bir popülasyondan seçilir. Balıklar muhafaza periyodunda ve test süresince günlük olarak vücut ağırlıklarının en az 2%'lik ve tercihen 4%'lük payı kadar besinle beslenmelidir.

Başlangıç periyodunu takiben, ölümler 48 saat kaydedilir ve aşağıdaki ölçütler uygulanır:

- Yedi gün içinde popülasyonun 10% 'undan fazla gerçekleşen ölümlerde bütün serideki sonuçlar kabul edilmez.
- Yedi gün içinde popülasyondaki 5% ve10% arasındaki ölümlerde yedi ilave gün daha havalandırılır. İlave yedi gün içinde %5 den daha fazla ölüm gerçekleşirse, bütün seri sonuçları kabul edilemez.
- Yedi gün içinde popülasyondaki 5%'den az ölümlerde seriden elde edilen sonuçlar kabul edilir.

Hasta olan balıklar atılır. Balıklar testten 2 hafta önce yada test esnasında tedavi edilmemiş olmalıdır.

1.7. Test tasarımı

Test tasarımı test derişimlerinin seçim ve aralıklarını ve her derişim seviyesindeki tankların sayısı ve tank başına düşen balık sayısını ilişkilendirilir. İdeal olarak test tasarımı:

a) Çalışmanın hedefi,
b) Kullanılacak istatistiksel analiz yöntemi,
c) Deneysel kaynakların maliyeti ve ulaşılabilirliğine göre seçilmelidir.

Hedef beyanı, eğer mümkünse, belirlenmesi gereken verilen fark büyüklükleri (büyüme hızı) için gerekli olan istatistiksel gücü yada alternatif olarak tahmin edilmesi gereken EC_x (x=10, 20, 30 ve tercihen 10'dan az olmayan kesinliğini) belirtmelidir. Bunlar olmadan, çalışmanın kesin büyüklüğü verilemez.

Bir istatistiksel yöntem ile optimum kullanım için en iyi (kaynak kullanımının en iyi olması) olan bir tasarımın bir başka yöntem içinde aynı şekilde uygun olmayabileceği bilinmelidir. Dolayısıyla LOEC/NOEC tahmini için önerilen tasarım regresyon ile analiz için önerilen ile aynı olmayabilir.

Pek çok halde, Stephan ve Rogers (8) tarafından açıklanan ve tartışılan sebeplerden dolayı regresyon analizi değişiklik (varyans) analizi için tercih edilir. Ancak uygun bir regresyon analizi yoksa (r^2 <0.9) NOEC/LOEC kullanılmalıdır.

1.7.1. Regresyon Analizi için tasarım

Regresyon ile analiz edilecek olan bir testte dikkate alınması gerekenler şunlardır.

a) Etki derişimi (örn. $EC_{10-20-30}$) ve test maddesinin ilgili olduğu etki derişim aralığının üstü, testte kullanılan test maddesinin derişimleri ile taranmalıdır. Etkin derişimlerin tahmini kesinliğinin yapılabilmesi, etkin derişimler test edilen derişim aralıklarının ortasındaysa en iyi olur. Bir ön aralık bulma testi uygun test derişimlerinin bulunması için faydalı olabilir.
b) Tatminkar istatistiki modelleme yapabilmek için, test en azından bir kontrol tankı ve farklı derişimler içeren 5 ilave tank içermelidir. Uygunsa, çözünürleştirici ajan kullanıldığında, test serilerine ilaveten en yüksek derişimde çözünürleştirici madde içeren bir kontrol grubu ile birlikte yürütülmelidir (bakınız bölümler 1.8.3 ve 1.8.4).
c) Uygun bir geometrik seri yada logaritmik seriler (9) (EK-III'e bakınız) kullanılabilir. Test derişimlerinin logaritmik aralıklandırılması tercih edilir
d) Eğer altıdan fazla tank varsa,tekrarlama yapmak yada konsantrasyon seviyelerinin yakın aralıklandırılmasını sağlamak için ilave tanklar kullanılabilir. Bu önlemlerin hepsi eşit derecede istenebilir.

1.7.2. Değişkenlik (varyans) analizi (ANOVA) ile NOEC/LOEC tahmini için tasarım

Her bir derişim için tercihen yedek tanklar bulunmalıdır ve her bir tank seviyesinde (10) istatistiki analiz yapılmalıdır. Bir birinin benzeri tanklar olmadan, tek bir balık dolayısıyla tanklar arasında değişkenlik toleransı yapılamaz. Ancak tecrübeler (11) tanklar arasındaki değişkenliğin, tank içi değişkenlikle(balıklar arası) karşılaştırıldığında değişkenliğin çok küçük olduğunu göstermiştir. Bu yüzden oldukça kabul edilebilir bir alternatif tek bir balıkta istatistiksel analiz yürütmektir.

Geleneksel olarak, 3.2 faktörünü geçmeyen bir geometrik seri oluşturan en azından beş test derişimi kullanılır.

Genel olarak, testler bir birine benzer tanklar ile yürütülür, bir birine benzer kontrol tanklarının sayısı ve dolayısıyla balıkların sayısı bir birine eşit büyüklükteki her bir test derişimindeki sayısının iki katı olmalıdır(12)(13)(14). Karşıt olarak, bir birine benzer tankların yokluğunda, kontrol grubundaki balıkların sayısı her bir test derişimindeki sayıyla aynı olmalıdır.

Eğer ANOVA tek bir balık yerine tanklara dayanıyorsa (yalancı özel büyüme hızı testlerinin kullanımını veya (bakınız bölüm 2.1.2) balıkların tek tek işaretlenmesini gerektirebilir), tankların derişim standart sapmasını belirlemek için yeterince bir birine benzer tanka ihtiyaç olabilir.

Bunun anlamı varyans analizindeki hata için serbestlik derecelerinin en azından 5 olması gerekir (10).

Eğer sadece kontroller tekrarlanırsa, hata değişkenliğinin sapma tehlikesi olacaktır. Çünkü söz konusu olan araştırılan büyüme hızının ortalama değeri ile artabilir. Büyüme hızı artan derişimle muhtemel azalma eğiliminde olduğu için, bu değişkenliğin hesabında abartıya neden olabilir.

1.8. İşlem

1.8.1. Balıkların seçimi ve tartılması

Testin başlangıcında balıkların ağırlığındaki değişimi en aza indirmek önemlidir. Kullanım için önerilen farklı türlerin uygun büyüklük aralıkları EK- I'de verilmiştir. Bu testte kullanılan bütün seri balıklar için, testin başlangıcındaki tek bir balık ağırlığının aralığı ortalama aritmetik ağırlığın ±10'unda tutulmalı, ve her durumda, %25'i geçmemelidir. Ortalama ağırlığı hesaplamak için testten önce bir balık örneğini tartmak önerilir.

Testin başlangıcından 24 saat önce stok balık popülasyonuna yiyecek verilmesi kesilmelidir. Balıklar daha sonra rasgele seçilmelidir. Genel bir anestezik kullanarak
(örneğin MS 222'nin parçası başına iki parça sodyum bikarbonat eklenerek nötralize edilen 100 mg/L sulu trikain metan sülfonat çözeltisi (MS222)), EK-I'de verilen kesinlikte ıslak ağırlıkları (kurutma kağıdı ile kurulanmış) ile tek tek tartılmalıdır. İstenen ağırlık aralığındaki balıklar saklanmalı ve saha sonra test kaplarına gelişigüzel dağıtılmalıdır. Her test kabındaki balığın toplam ağırlığı kaydedilmelidir. Anestezik kullanımı balık elleçlenmesinde (tartılması ve kurutma kağıdı ile kurulanması dahil) olduğu gibi yavru balıklarda,özellikle küçük olanlarda, stres ve yaralanmalara yol açabilir. Bu yüzden yavru balık elleçlenmesi stres ve yaralanmadan kaçınmak için mümkün olduğu kadar dikkatle yapılmalıdır.

Balıklar testin 28. gününde tekrar tartılır.(bakınız bölüm 1.8.6) Eğer besin oranının tekrar hesabı gerekli olursa, balıklar testin 14. gününde tekrar tartılabilir (bakınız bölüm 1.8.2.3). Fotografik yöntem gibi diğer yöntemlerle yem payları ayarlanarak ve balıkların boyutundaki değişimi belirlemek için kullanılabilir.

1.8.2. Maruz Kalma Şartları

1.8.2.1. Süre

Testin süresi ≥28 gündür.

1.8.2.2. Yükleme hızları ve depolama yoğunlukları

Yükleme hızı ve depolama yoğunluğunun kullanılan türler için uygun olması önemlidir(bakınız EK-I). Eğer depolama yoğunluğu çok fazla ise, aşırı kalabalık olmasından dolayı stres düşük büyüme hızlarına ve hastalığa yola açar. Eğer çok düşükse, büyümeyi etkileyecek bölgesel davranış gözlenir. Her iki durumda da yükleme hızı, ASV'nin %60'ı oranında çözünmüş oksijen derişiminin havalandırma olmadan sağlanabileceği kadar olmalıdır. Halka testi (2) gökkuşağı alabalığı için, 3-5 g ağırlığında 16 balığın 40 litre hacme doldurulduğu nispette bir yükleme hızının uygun olduğunu göstermiştir. Test boyunca önerilen su uzaklaştırma sıklığı 6 litre/balık/gündür.

1.8.2.3. Besleme

Balıklar kabul edilebilir bir besleme hızı oluşturabilecek bir hızda uygun bir besinle beslenmelidir.(Ek-I). Mikrobiyal büyüme ve su bulanıklığından kaçınmak amacıyla dikkatli olunmalıdır. Gökkuşağı alabalıkları için günlük olarak toplam vücut ağırlıklarının % 4'ü kadar bir besleme hızı bu koşulları sağlar.(2)(15)(16)(17). Günlük oran eşit olarak ikiye bölünebilir ve gün içinde aralarında 5 saat olan iki ayrı öğün olmak üzere verilebilir. Yiyecek

payı her bir kaptaki ilk toplam balık ağırlığına dayanır. Eğer balıklar 14. günde tekrar tartılırsa, yiyecek payı tekrar hesaplanır. Balıklar tartımdan 24 saat önce yemlenmemelidir.

Yenilmeyen besin ve posa test kaplarının dibi vakumlanarak dikkatlice temizlenmelidir.

1.8.2.4. Işık ve sıcaklık

Işıklandırma süresi ve su sıcaklığı test türleri için uygun olmalıdır.(Ek-I)

1.8.3. Test derişimleri

Test tasarımı ne olursa olsun normal olarak 5 farklı test derişimi gereklidir. (bkz bölüm 1.7.2) Test maddesinin toksisitesi hakkında bilgi sahibi olmak (akut test ve aralık bulma çalışmalarından) uygun derişimleri belirlemekte yardımcı olabilir. Eğer 5 den az sayıda derişim kullanılacaksa gerekçeler onaylanmalıdır. En yüksek derişim maddenin sudaki çözünürlük sınırını geçmemelidir. Stok çözelti hazırlamak için bir çözünürleştirici ajan kullanıldığında, son derişim; 0.1 ml/L'den büyük olmamalıdır ve tercihen bütün test kaplarında aynı olmalıdır. (bkz bölüm 1.6.3). Ancak bu tür maddelerin kullanımından mümkün olduğunca kaçınılmalıdır.

1.8.4. Kontroller

Seyrelme suyu kontrollerinin sayısı test tasarımına bağlıdır (bakınız bölüm 1.7-1.7.2). Eğer çözünürleştirici ajan kullanılmışsa, çözünürleştirici ajan içeren sayıda kontrol seyrelme suyu kontrollerine paralel olarak yürütülmelidir.

1.8.5. Analitik tayin ve ölçümlerin sıklığı

Test maddesinin derişimleri test boyunca düzgün aralıklarla ölçülür(aşağıya bakınız). İç akış testlerinde, seyrelme çözeltisi ve toksin stok çözeltilerinin akış hızları aralıklar ile kontrol edilmelidir ve test boyunca %10 dan fazla değişiklik gözlenmemelidir. Test maddelerinden derişimleri nominal değerlerinin ±%20'si içinde olduğu durumlarda, en az olarak, (%80-%120 aralığında, bkz bölüm1.6.2 ve1.6.3) en düşük ve en yüksek derişimlerin testin başında daha sonra haftalık periyotlarda ölçülmesi önerilir. Test maddesinin derişiminin nominal değerin ±%20'si içinde kalmadığı durumlarda (test maddesinin kararlılığı baz alınarak), bütün derişimleri aynı şartlarda analiz etmek gereklidir.

Test maddelerinin derişimlerinin nominal değerlerin ±%20'si içinde olmasının beklendiği yarı-durağan testlerde, en az olarak, en düşük ve en yüksek derişimlerin hazırlandıktan sonra ve çalışmanın başında yenilemeden hemen önce taze olarak ve daha sonra haftalık olarak ölçülmesi önerilir. Test maddesinin derişiminin nominal değerin ±%20'si içinde kalmadığı durumlarda (test maddesinin kararlılığı baz alınarak), daha kararlı maddelerin bütün derişimleri aynı şartlarda analiz etmek gereklidir.

Sonuçların ölçülen derişimlere dayanması önerilir. Ancak test çözeltisindeki maddenin derişiminin nominal değerin ±%20'si yada test boyunca ölçülen başlangıç derişiminde kaldığına ilişkin kanıt varsa, sonuçlar nominal yada ölçülen değerlere dayandırılabilir.
Örneklerin filtrelenmesi (0.45 mikron gözenekli filtre ile) yada santrifüj edilmesi gerekebilir. Santrifüjleme tavsiye edilen işlemdir. Eğer test malzemesi filtrelere adsorplanmıyorsa filtreleme de tercih edilebilir.

Test boyunca çözünmüş oksijen, pH ve sıcaklık bütün test kaplarında ölçülmelidir. Toplam sertlik, bazlık ve tuzluluk kontrolde ve en yüksek derişime sahip tankta ölçülmelidir. Çözünmüş oksijen ve tuzluluk (eğer gerekli ise) en az 3 kez ölçülmelidir. (Testin başında ortasında ve sonunda). Yarı durağan testlerde, çözünmüş oksijenin daha sık, tercihen en azından haftada bir kez suyun yenilenmesinden sonra ölçülmesi tercih edilir. İç-akış testlerinde pH, başlangıçta ve durağan yenileme testinde her su yenilemesinin sonunda ölçülmelidir. Sıcaklık en azından bir test kabında tercihen sürekli olarak kontrol edilmelidir.

1.8.6. Gözlemler

Ağırlık: Yaşayan balıklar testin sonunda ıslak ağırlık (kurulama kağıdı ile kurutulmuş) cinsinden ya tek tek yada gruplar halinde ölçülmelidir. Balıkların işaretlenmesini gerektiren tek tek tartıma göre toplu halde tartılmaları tercih edilir. Tek bir balığın özgül büyüme hızının belirlenmesi için tek tek balıkların tartılmasında, hayvanların stres altına girmemelerini sağlayacak bir işaretleme tekniği seçilir. (alternatif olarak dondurup işaretleme ve renkli bir işaretleme şeridi kullanmaktır)

Balıklar test periyodunda günlük olarak incelenmeli ve herhangi bir dış anomali (kanama, renk yitimi) ve anormal davranış not edilmelidir. Ölümler kaydedilmeli ve ölü balıklar mümkün olduğu kadar çabuk uzaklaştırılmalıdır. Yükleme hızı ve depolama yoğunluğu tanktaki balıkların büyüme hızına etki edecek ölçüde ise ölü balıkların yerine yenisi konulmaz. Ancak yemleme hızı ayarlanmalıdır.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Bu test deneysel anlamda ciddi değişime uğrayabildiği için örneğin test hücrelerinin sayısı, test derişimlerinin sayısı, balık sayısı gibi, bir uzman istatistikçinin hem test tasarımında hem de sonuçların yorumlanmasında bulunması önerilir. Test tasarımında bulunan tercihler açısından, yardımcı istatistiki işlemler burada verilmemiştir. Büyüme hızları ölüm oranı%10'u geçen test kaplarında hesaplanmamalıdır. Ancak bütün test derişimlerinde ölüm oranı belirtilmelidir.
Verilerin analiz için hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, genel kavram, özgül büyüme hızının t_1 ve t_2 zamanları arasındaki ilişkidir. Bu çeşitli şekillerde, balıklar tek tek işaretlenip işaretlenmediğine tank ortalaması gerekip gerekmediğine göre tanımlanır.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

burada,

r_1= tek bir balığın özgül büyüme hızı,
r_2= tanktaki tüm balıkların ortalama büyüme hızı,
r_3= yalancı özgül büyüme hızı,
w_1,w_2 = balıkların t_1 ve t_2 zamanlarındaki ağırlığı,
$\log_e w_1$= çalışma periyodunun başında tek bir balığın ağırlığının logaritması,
$\log_e w_2$ =çalışma periyodunun sonunda tek bir balığın ağırlığının logaritması,

$\overline{\log_e w_1}$ = çalışma periyodunun başında tanktaki w_1 değerlerinin ortalama logaritması,

$\overline{\log_e w_2}$ = çalışma periyodunun sonunda tanktaki w_2 değerlerinin ortalama logaritması,
t_1, t_2 =çalışma periyodunun başı ve sonundaki zaman (gün),
r_1, r_2, r_3 değerleri 0-28 günlük periyottan yada 0-14 yada 14-28 günlük periyottan hesaplanır. (14. gündeki ölçüm yapıldıktan sonra)

2.1.1. Sonuçların regresyon ile analizi (konsantrasyon-cevap modeli)

Bu yöntem özgül büyüme hızı ve derişim arasında uygun bir matematiksel ilişki ortaya koyar ve istenen her EC değerindeki EC_x değerinin hesaplanmasını sağlar. Bu yöntemi kullanarak tek bir balık için "r" değerinin hesaplaması gerekli değildir ve bunun yerine analiz tank ortalaması r değerine (r_2) dayandırılabilir. Son yöntem daha tercih edilir. Özellikle daha küçük türler için daha uygundur.
Tank ortalaması özgül büyüme değerleri (r_2) konsantrasyon-cevap ilişkisini sorgulamak için derişime karşı grafiksel olarak çizilmelidir.

r_2 ve derişim arasındaki ilişkiyi ifade etmek için, uygun bir model seçilmelidir ve bu seçim uygun sebeplerle desteklenmelidir.

Eğer her bir tankta sağ kalan balıkların sayısı eşit değilse, basit yada lineer olmayan model oluşturma süreci eşit olmayan büyüklükteki grupların tartılmasına izin vermelidir.

Uyarlama modeli, örneğin EC_{20} ve onun dağılımının tahminine olanak vermelidir (Standard hata veya güven aralığı). Uygunlaşmış modelin grafiği verilerle uygun olarak verilmelidir ve böylelikle modelin uyumunun yeterliliği izlenebilir.(8)(18)(19)(20)

2.1.2. LOEC tahmini için sonuçların analizi

Eğer test bütün derişim seviyelerinde yedek tanklar (tekrarlama) içeriyorsa, LOEC tahmini özgül büyüme hızı tank ortamalarının, 0.05 lik bir olasılık seviyesinde anlamlı fark için en düşük konsantrasyonu tanımlamada ki kontroller için ortalama r ile her bir konsantrasyon için ortalama r yi karşılaştıran uygun bir metot (örn. Dunnett veya William testi (12)(13)(14)(21) kullanılarak, varyans analizlerine (ANOVA) dayandırılmalıdır. Eğer parametrik metotlar için gerekli olan kabuller normal olmayan dağılımları (örn. Shapiro-Wilk testi) veya heterojen varyans (Barlett testi) verirse, ANOVA veya ağırlıklı ANOVA uygulanmadan önce verilerin homojen varyanslara dönüştürme zorunluluğuna önem verilmelidir.

Eğer test her bir konsantrasyonda tekrar tanklarını içermiyorsa, tanklara dayanan bir ANOVA duyarsız veya mümkün olmayacaktır. Bu durumda, kabul edilebilir bir uyuşma ANOVA'yı tekbir balık için yalancı büyüme hızı r_3 'e dayandırmaktadır.

Test konsantrasyonları için ortalama r_3 değeri kontrollerdeki r_3 değerleri ile karşılaştırılabilir. LOEC daha önceki gibi belirlenebilir. Bu yöntemde tanklar arasındaki değişikliğe karşı koruma sağlamadığının bilinmesi ve bunun ötesinde tek tek balıklardaki değişkenliğe karşı da koruma sağlamadığının bilinmesi gereklidir. Ancak tecrübeler göstermiştir ki (8), tank arasındaki değişkenliğin tank içi değişkenliğe (örn. balıklar arası) göre çok küçük olmaktadır. Eğer analizlerde tek tek balık kullanılmıyorsa, aykırı değer tanımlaması ve doğrulamasındaki yöntem onun kullanımını sağlamalıdır.

2.2. Sonuçların yorumlanması

Sonuçlar çözeltilerde ölçülen toksik madde derişiminin analitik yöntemin tayin sınırı yakınında olması yada yarı-durağan testlerde test maddesinin derişimi yenilemeden önce ve taze hazırlanmış çözeltide düşüyorsa dikkatle yorumlanmalıdır.

2.3. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir.

2.3.1. Test maddesi

- Fiziksel doğası ve ilgili fizikokimyasal özellikler
- Saflık ve test maddesinin miktar tayini için kullanılan analitik yöntem ile birlikte kimyasal tanımlama verisi

2.3.2. Test türleri

- Bilimsel adı
- Alt ırk, büyüklüğü, tedarikçi, herhangi bir ön işlem yapılıp yapılmadığı,

2.3.3. Test koşulları

- Kullanılan test yöntemi (iç akış yada yarı durağan yenileme, yükleme, muhafaza v.b.)
- Test tasarımı (örneğin test hücrelerinin sayısı,kap başına düşen balık sayısı, test derişimleri ve tekrarları)
- Stok çözeltilerin hazırlanma yöntemi ve yenileme sıklığı (çözünürleştirici ajan, kullanıldığında derişimi verilmelidir.)
- Nominal test derişimleri, test kaplarındaki ölçülen değerlerin ortalaması ve onların standart sapmaları ve gerçek çözeltideki test maddesinin konsantrasyonlarına başvurulan ölçümlerin kanıtının elde edilmesini sağlayan metot.
- Seyreltme suyunun özellikleri., pH, sertlik, sıcaklık, alkalinite, çözünmüş oksijen konsantrasyonu, kalıntı klor seviyesi(eğer ölçüldüyse), toplam organik karbon, asılı katılar, test ortamının tuzluluğu (eğer ölçüldüyse) ve yapılan diğer ölçümler
- Test kaplarındaki su kalitesi, pH, sertlik, sıcaklık ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu
- Besleme hakkında ayrıntılı bilgi (besinin türü, kaynağı, verilen miktar ve sıklığı

2.3.4. Sonuçlar

- Sonuçların yaşama için gerekli olan ölçütleri sağladığının kanıtı, herhangi bir test derişimindeki ölüm oranı hakkında veriler

- Kullanılan istatistiki analiz teknikleri, balık veya tekrarlara dayanan istatistikler, verilerin işlenmesi ve kullanılan tekniklerin doğrulaması
- 0, 14 (eğer ölçüydüyse) ve 28. günlerde herbir balık ve ortalama balık ağırlıklarına ilişkin tablolanmış veriler, tank ortalaması ve 0-28 ve 0-14 (eğer ölçüldüyse) ve tercihen 14-28. günler arası yalancı büyüme hızları
- Tablosal ve grafiksel formda istatistiki analiz (regresyon analizi yada ANOVA) sonuçları LOEC (p=0.05) ve NOEC veya ECx değerleri mümkünse standart hataları ile
- Balıklar tarafından gösterilen beklenmeyen tepkiler ve test maddesi tarafından sebep olunan gözlenebilir etkiler.

3. KAYNAKLAR

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UKRing 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, pp 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 (Brachydaniorerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 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, pp 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, Minesota.

(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, pp 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rain bow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

(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, pp 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.
(14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose leve ls are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 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, Oncorhynchusmykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, 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, 33-41.
(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
(18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. 11, 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, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
(21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510 -531.

Ek-I

Test için önerilen balık türleri ve uygun test şartları

Türler	Önerilen test sıcaklığı aralığı (°C)	Işıklandırma periyodu (saat)	Başlangıç balık ağırlığı için önerilen aralık (g)	İstenilen ölçüm kesinliği	Yükleme Hızı (g/L)	Depolama yoğunluğu (litre başına)	yiyecek	Test süresi
Önerilen türler								
Oncorhynchus Mykiss gökkuşağı alabalığı	12.5-16	12-16	1-5	En yakın 100 mg	1.2-2.0	4	Uygun, kızartılmış somon yiyeceği	>28
Diğer iyi belgelenmiş türler								
Danio rerio zebrabalığı	21-25	12-16	0.050-0.100	En yakın 1 mg	0.2-1.0	5-10	Canlı yiyecek (*Brachionus Artemia*)	>28
Oryzias latipes pirinç balığı	21-25	12-16	0.050-0.100	En yakın 1 mg	0.2-1.0	5-20	Canlı yiyecek (*Brachionus Artemia*)	>28

Ek-II

Seyrelme suyunun bazı kabul edilebilir kimyasal özellikleri

MADDE	DERİŞİMLER
Partikül halindeki madde	<20 mg/L
Toplam organik karbon	<2 mg/L
İyonlaşmamış amonyak	<1 µg/L
Kalıntı klor	<10 µg/L
Toplam fosforlu organik pesitisit	<50 ng/L
Toplam klorlu organik pestisit + poliklorlu bifeniller	<50 ng/L
Toplam organik klor	<25 ng/L

Ek-III

Toksisite testi için uygun derişimlerin logaritmik serisi

Kolon (100 ile 10 yada 10 ile 1 arasındaki derişimlerin sayısı)*						
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	1+	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

*Bir kolondan beş yada daha fazla ardışık derişim seçilebilir. X kolonundaki derişimlerin orta noktaları arasın (2x+1) olarak bulunmuştur. Listedeki değerlerin ifade ettiği derişimler yüzde hacim yada yüzde ağırlık olarak ifade edilir.(mg/l yada µg/l). Değerler gerektiğinde herhangi 10 kuvveti bölünüp çarpılabilir. Kolon 1 toksisite seviyesine dikkate değer bir belirsizlik varsa kullanılabilir.

C.15 BALIK, EMBRİYO ÜZERİNDE KISA DÖNEMLİ TOKSİSİTE VE YAVRU BALIK EVRELERİ

1. YÖNTEM

Bu kısa dönem toksisite testi OECD TG 21 (1998) yöntemi ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu kısa dönem toksisite testi, balık embriyoları ve erken larva evreleri için yeni döllenmiş yumurta evresinden erken larva evresinin sonuna dek olan maruz kalmasını kapsayan kısa dönemli bir testtir. Embriyo ve larva testinde yem kullanılmaz ve test larvalarının yumurtadan yeni çıktıkları anda bitirilir.

Bu test, test edilen türlere ve büyüme evrelerine kimyasalların ölümcül ve sınırlı bir ölçüde de yarı-ölümcül etkilerini açıklamak için önerilmiştir. Bu test a) ölümcül ve yarı ölümcül testler arasında bir köprü kurmak b) Tüm Erken Yaşam Evresi testi ya da kronik toksisite evreleri için izleme testi olarak kullanmak c) tarımsal tekniklerin iç kaynaklı besleme evresinden dış kaynaklı besleme evresine kadar olan değişimleri içermekte yeterli olmadığı türler için faydalı bilgiler sağlar.

Kimyasalların balıklar üzerine olan kronik toksisitesini hesaplamada yalnızca balığın bütün yaşam evrelerini kapsayan testlerin kesin hesaplamaya imkân verebileceği ve yaşam evrelerinde herhangi azalmış bir maruz kalmanın duyarlılığı azaltacağı ve kronik toksisitenin kaba hesabına neden olacağı gerçeği akıldan çıkarılmamalıdır. Bu yüzden embriyo ve larva testleri tüm yaşam testinden özellikle yüksek yağı seven karakterde olan kimyasallar (P_{ow}>4) ve özgül bir modda etki gösteren kimyasallar için daha az duyarlı olacaktır. Ancak, özgül olmayan ve narkotik etki yaratan kimyasallar için iki test arasında daha küçük farklılıklar beklenir.(1)

Bu testin yayınlanmasından önce bu embriyo ve erken larvaya ilişkin pek çok tecrübe bir tatlı su balığı olan Denio rerio Hamilton-Buchanan'dan (Teleostei, Cyprinidae- yaygın adıyla zebra balığı) elde edilmiştir. Bu türler için test performansı hakkında daha detaylı rehber Ek-I'de verilmiştir. Bu, tecrübe sahibi olunan diğer başka balıklarla da bu testin yürütülmesine engel değildir (tablo 1).

1.2. Tanımlar ve birimler

Etki Gözlemlenen En Düşük Konsantrasyon (LOEC): Test maddesinin kontrolle karşılaştırıldığında kayda değer bir etki gösterdiği ($p<0.05$) en düşük test konsantrasyonudur. Ancak LOEC'nin üzerindeki bütün test konsantrasyonları LOEC'de gözlenene eşit yada daha fazla zararlı etkiye sahip olmalıdır.

Etki Gözlemlenmeyen Konsantrasyon (NOEC): Test maddesinin LOEC değerinin hemen altındaki konsantrasyondur.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Embriyo ve erken larva(sac–fry) evresindeki balıklar farklı konsantrasyonlarda ve suda çözünmüş test maddelerine maruz bırakılır. Bir protokol çerçevesinde yarı-durağan yâda iç-

akış işlemi arasında seçim mümkündür. Bu seçim test maddesinin doğasına bağlıdır. Bu test yeni döllenmiş yumurtaların test bölmelerine bırakılmaları ile başlar ve test çemberlerindeki larvaların vitellüs keseleri tümüyle adsorplandığından ya da kontrollerde açlıktan ölümler başladığından sonlandırılır. Ölümcül ve yarı ölümcül etkiler değerlendirilir ve kontrol değerleri ile karşılaştırılarak, olumsuz etki gözlemlenen en düşük konsantrasyon ve olumsuz etki gözlemlenmeyen konsantrasyon belirlenir. Alternatif olarak bunlar belli bir verilen etkiye yol açacak konsantrasyonu hesaplamak için regresyon modeli ile de analiz edilebilir. (LC/EC_x burada x % etki olarak tanımlanır).

1.4. Test maddesi hakkında bilgi

Bu test için tercihen seçilen test türleri ile yürütülen akut toksisite testinin sonuçları mevcut olmalıdır. (bkz yöntem C.1). Sonuçlar testin erken yaşam evrelerinde uygun konsantrasyon aralığının seçilmesi için kullanışlı olabilir.
Test maddesinin sudaki çözünürlüğünü (test suyundaki çözünürlüğüde içeren) ve buhar basıncının bilinmesi gereklidir. Test çözeltilerindeki maddenin miktar tayini için güvenilebilir, rapor edilen doğrulukta ve tayin sınırında bir analitik yöntem var olmalıdır.
Test koşularının oluşturulmasında test maddesi ile ilgili kullanışlı olabilecek bilgiler, yapısal formül, maddenin saflığı, sudaki ve ışıktaki kararlılık, pK_a, P_{ow} ve kolay biyobozunma için testin sonuçlarıdır.(bkz yöntem C.4)

1.5. Testin geçerliliği

Testin geçerli olabilmesi için aşağıdaki koşullar sağlanmalıdır:
- Kontrollerdeki döllenmiş yumurtalardaki yaşayabilirlik ve ilgili olduğunda, sadece çözücülü kaplar Ek-II ve Ek-III'te tanımlanan limitlere eşit ya da büyük olmalıdır.
- Çözünmüş oksijenin konsantrasyonu, hava doygunluk değeri (ASV) değerinin %60'ı ve %100'ü arasında değişmelidir.
- Ölçüm bölmelerindeki suyun sıcaklığı test maddesi testin herhangi bir anında ya da testin takip eden günlerinden herhangi birinde ±1.5° C'den fazla değişmemelidir ve test türleri için belirlenen sıcaklık aralığında tutulmalıdır.(Ek-II ve Ek-III)

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Test bölmeleri

Kimyasal olarak aktif olmayan(inert) herhangi bir kap yada cam kaplar kullanılabilir. Kapların boyutları yükleme hızı ile uyumlu olacak şekilde olmalıdır. (bkz bölüm 1.7.1.2)

Test bölmelerinin test alanında rasgele konumlandırılması önerilir. Her bir muamelenin her bir blokta bulunacağı rasgele bloklanmış bir tasarım, tümüyle bloklanmış bir tasarıma,eğer laboratuvarda bloklama ile giderilebilecek sistematik etkiler varsa, tercih edilir. Bloklama, eğer kullanılmışsa, takip eden veri analizi için dikkate alınmalıdır. Test bölmeleri olumsuz etkilerden perdelenmelidir.

1.6.2. Balık türlerin seçimi

Önerilen test türleri Tablo 1A'da verilmiştir. Ancak bu diğer türlerin kullanımına engel değildir (örnekler Tablo 1B'de verilmiştir) ancak test prosedürü uygun test koşularına uyarlanmalıdır. Bu durumda seçimin nedeni ve deneysel yöntem için sebep belirtilmelidir.

1.6.3. Kuluçkadan çıkmış balıkların muhafaza edilmesi

Kuluçka stokunun tatminkar koşullarda saklanmasına ilişkin ayrıntılar OECD TG 210[1] ve referans (2), (3), (4), (5), (6) 'da bulunabilir.

1.6.4. Larva ve embriyoların elleçlenmesi

Embriyo ve larvalar ana test kabında birbirine bağlantı yerleri ve uçları ile bağlanmış ve test çözeltisinin kap boyunca akmasına olanak verecek küçük kaplarda bırakılabilir. Bu kaplar boyunca türbülanslı olmayan bir akış kabı yukarı aşağı oynatacak ancak organizmaları her zaman suyun altında bırakacak bir kol yardımıyla sağlanabilir. Bunun için sifon-akış sistemi kullanılabilir. Döllenmiş yumurtalar ya da somon balıkları larvaların kuluçka sonrası düşmesine olanak sağlayacak yeterince büyük açıklıkta askılar yardımıyla desteklenilir. Tümüyle günlük yenilemede yarı durağan testlerde embriyoları ve larvaları uzaklaştırmak için pastör pipetlerin kullanımı uygun olabilir.(bkz paragraf 1.6.6)

Yumurtaları ana kap içinde yumurta kapları, kenetleri(grit) yada bağlantıları kullanıldığında, her larva salımından sonra bunlar uzaklaştırılmalıdır ancak bağlantılar balıkların kaçmasını engellemek için tutulmalıdır. Larvaları transfer etmek gerekiyorsa, larvalar havayla temas ettirilmemelidir ve balıkları yumurta kaplarından serbest bırakmak için ağ kullanılmamalıdır.(bu tür bir uyarı daha az kırılgan türler için gerekli olmayabilir) Transfer zamanı türlere göre değişir ve transfer her zaman gerekli olmayabilir. Yarı durağan teknik için, geniş ağızlı laboratuvar erlenleri ya da derin olmayan kaplar kullanılabilir ve eğer gerekli ise, kabın tabanının az üzerinde yer alan bir bağlantı ile bağlantılanabilir. Eğer bu kapların hacmi yükleme gerekleri için yeterli ise embriyo transferi ve larva transferi gerekli olmayabilir.(bkz 1.7.1.2.)

1.6.5. Su

Test türlerinin Ek-IV'te belirtilen kimyasal karakteristiklere uyan ve Ek–II ve Ek-III'teki açıklanan şartlarda türlerin yaşayabildiği herhangi bir su test suyu olarak kullanılabilir. Su test boyunca sabit kalitede olmalıdır. Suyun pH değeri 6.0 ila 8.5 aralığında olmalıdır, ancak verilen bir testte ise ±0.5 pH birimi aralığında olmalıdır. Seyrelme suyunun gereksiz olarak test sonuçlarını etkilemeyeceğinden (örneğin test maddesi ile kompleksleşerek) veya kuluçkadan çıkmış balık stoklarının performansının olumsuz etkilenmediğinden emin olmak için aralıklarla analiz için örnek alınmalıdır. Ağır metallerin (örn, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) ve temel anyonların ve katyonların (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pestisitlerin (toplam fosfatlı organik pestisit ve klorlu organik pestisit), toplam organik karbonun ve asılı katıların tayini suyun kalitesinin bağıl olarak sabit kalitede olduğu bilinen bir zamanda örneğin 3 ayda yapılmalıdır. Su kalitesinin en azından 1 yıl boyunca sabit kalitede olduğu durumlarda ölçümler daha az sıklıkta ve ölçüm aralıkları uzatılarak yapılabilir (örneğin, her 6 ayda bir).

1.6.6. Test Çözeltileri

Belirlenen konsantrasyonlardaki test çözletileri stok çözeltiden seyreltme yapılarak hazırlanır. Stok çözelti test maddesini uygun mekanik araçlarla (karıştırıcı, ultrasonikasyon) seyreltme

[1] OECD, Paris, Test Rehberi, 210, Balık Erken-Yaşam Aşamalı Toksisite Testi

suyunda basitçe çözüp çalkalayıp karıştırarak hazırlanır. Uygun derişik stok çözelti elde etmek için doyurma kolonları (çözünürlük kolonları) kullanılabilir.

Çözücülerin ve dağıtıcıların (çözünürleştirici ajanlar) kullanımı bazı durumlarda uygun ve derişik bir stok çözelti hazırlamak için gerekli olabilir. Kullanılabilen çözücüler etanol, metanol, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetil eter, dimetilformamit ve trietilen glikoldür. Kullanılabilen dağıtıcılar Cremephor RH–40, Tween 80, %0.01'lik metilselüloz ve HCO-40'tır. İç akış testinde bakteri üremesine neden olabilecek kolaylıkla bozunabilir ajanları (örneğin, aseton) kullanırken dikkatli olunmalıdır. Çözünürleştirici ajan kullanıldığında, balık büyümesine yada yavru balıklara çözücü kontrolü ile anlaşılabilen gözle görülebilir bir olumsuz etkisi olmamalıdır. Bu tür maddelerin kullanılmaması için her tür çaba gösterilmelidir.

Yarı durağan teknik iki farklı yenileme işlemi takip edilebilir:(i) yeni test çözeltileri temiz kaplar içerisinde hazırlanır ve yaşayan yumurtalar ve larvalar havayla temas etmesini engelleyerek eski çözeltilerin küçük hacimleri halinde yeni kaplara transfer edilir.(ii) test suyunun belirli bir hacmi değiştirilirken test organizmaları kaplar içerisinde tutulur. Su yenileme sıklığı test maddesinin kararlılığına bağlıdır ancak günlük su yenilemesi tavsiye edilir. Eğer öncül kararlılık testlerinden test maddesi konsantrasyonunun yenileme periyodu boyunca kararlı olmadığı görülürse (nominal değerin %80-120'si veya ölçülen başlangıç konsantrasyonunun %80'i) iç-akış testinin kullanımında dikkatli olunmalıdır. Her durumda, su yenileme periyodunda larvaların stres altına girmemelerine dikkat edilir.

İç-akış testleri için, sürekli olarak test kaplarına seriler halinde test maddesinin (örneğin, metreleme pompası, orantılı seyreltici, doygunlaştırıcı sistem) farklı konsantrasyonlardaki stok çözeltilerini aktaran ve seyrelten bir sisteme ihtiyaç vardır. Stok çözeltilerinin ve seyreltme suyunun akış hızı, tercihen günlük olarak, test boyunca %10' dan fazla değişmeyecek biçimde belirli aralıklarla kontrol edilmelidir. 24 saatte bir, en az 5 test kabı hacmine eşdeğer bir akış hızı uygun bulunmuştur (2).

1.7. İşlem

Balık embriyoları ve erken larvalar üzerine toksisite testleri hakkında kullanışlı bilgiler literatürde mevcuttur ve bunlardan bazıları bu metnin literatür kısmında verilmiştir.(7)(8)(9).

1.7.1. Maruz kalma koşulları

1.7.1.1. Süre

Test, yumurtalar döllendikten tercihen 30 dk sonra başlatılmalıdır. Embriyolar test çözeltisine blastoma (Bir zigotun bölünerek 8 hücreli bir hücre topluluğuna dönüşmüş hali) evresinin başlangıcından önce ya da hemen sonra ancak her iki durumda da gastrula evresinin (blastomadan sonraki hücre gelişim evresi) başlangıcından önce daldırılmalıdır. Ticari bir tedarikçiden elde edilen yumurtalar için, teste döllenmeden hemen sonra başlamak mümkün olmayabilir. Testin duyarlılığı testin başlangıcının geciktirilmesinden ciddi olarak etkileneceği için, test döllenmeden en geç 8 saat sonra başlatılmalıdır. Larvalar maruz kalma zamanında beslenmediği için, test larvaların vitellüs kesesi test bölmeleri tarafında tamamen adsorplanmadan hemen önce yada kontrollerdeki açlıktan dolayı ölümlülükler gerçekleşmeden bitirilmelidir. Süre test türlerine göre değişir. Bazı tavsiye edilen süreler Ek-II ve Ek-III'te verilmiştir.

1.7.1.2. Yükleme

Testin başlangıcındaki döllenmiş yumurtaların sayısı istatistiksel gereksinimleri karşılamalıdır. Yumurtalar işlemler arasına rasgele dağıtılmalıdır ve en azından 30 döllenmiş yumurta eşit olarak (yada bazı türlerle çalışırken eşit sayı yakalamak çok zor olduğundan eşite yakın) en azından 3 eşdeğer test bölmesi arasında konsantrasyon başına dağıtılmalıdır. Yükleme hızı ASV'nin %60'ı oranında çözünmüş oksijen konsantrasyonunun havalandırma olmadan sağlanabileceği kadar olmalıdır. İç-akış testleri için, 24 saatte 0.5 g/L'yi geçmeyen bir yükleme hızı ve herhangi bir anda 5 g/L çözeltiyi geçmeyen değerler önerilir.

1.7.1.3. Işık ve sıcaklık

Işıklandırma süresi ve su sıcaklığı test türleri için uygun olmalıdır. (bkz Ek-II ve Ek-III). Sıcaklığın izlenmesi için, ilave bir test kabının kullanımı uygun olabilir.

1.7.2. Test konsantrasyonları

Normal olarak 3.2'nin katlarını geçmeyecek şekilde değişen 5 farklı konsantrasyon gereklidir. Uygun test konsantrasyonlarının seçiminde akut çalışmadaki maruz kalma periyodunu LC_{50} ile ilişkilendiren eğri dikkate alınır. Bazı durumlarda 5'ten az konsantrasyonun kullanımı, örneğin sınır testlerinde, ya da daha dar bir konsantrasyon aralığının kullanımı uygun olabilir. Eğer 5'ten az konsantrasyon kullanılmış ise bunun doğrulamasının gerçekleştirilmesi gerekir. 96 saatlik LC_{50} değeri ya da 100 mg/L'den fazla konsantrasyondaki madde konsantrasyonlarının test edilmesine gerek yoktur. Maddeler sudaki çözünürlüklerinin üzerindeki konsantrasyonlarda test edilmemelidir.

Test çözeltilerinin hazırlanmasına yardım etmek amacıyla çöznürleştirici ajan kullanıldığında (bakınız bölüm 1.6.6), test kabındaki son ajan konsantrasyonu 0,1 ml/L' yi geçmemeli ve bütün test kaplarında aynı olmalıdır.

1.7.3. Kontroller

Kontroller için tek bir seyrelme suyu (gerekli ise paraleli hazırlanır) ve eğer gerekli ise, çözünürleştirici ajan içeren bir kontrol (gerekirse paraleli hazırlanır) test sersine ilave olarak yürütülmelidir.

1.7.4. Analitik belirleme ve ölçümlerin sıklığı

Test maddesinin konsantrasyonları test boyunca düzgün aralıklarla ölçülür. Yarı durağan testlerde test maddesinin konsantrasyonunun nominal değerin ±%20'si içinde kalması beklendiği durumlarda (%80–120 aralığında, bkz kesim 1.4 ve1.6.6), en düşük ve en yüksek konsantrasyonların taze hazırlandığında ve daha sonra test içinde düzgün dağıtılmış 3 aralıkta ölçülmesi önerilir (Analizler aynı çözeltiden-taze hazırlandıktan sonra ve yenilemede yapılmalıdır).
Test maddelerinin konsantrasyonlarının nominal değerlerin ±%20'si içinde olmasının beklenmediği durumlarda (test maddesinin kararlılığı baz alınarak), bütün konsantrasyonları taze hazırlanmış ve yenilemede fakat aynı şartlarda analiz etmek gereklidir(test içinde düzgün dağıtılmış 3 aralıkta).

Test maddesi konsantrasyonlarının yenilemeden önce belirlenmesi için her bir konsantrasyonda tek bir paralel test kabı yeterlidir. Ölçümler 7 günden daha fazla aralıklarda yapılmamalıdır.

Sonuçların ölçülen konsantrasyonlara dayanması önerilir. Ancak test çözeltisindeki maddenin konsantrasyonunun nominal değerin yada ±%20'si yada test boyunca ölçülen başlangıç konsantrasyonunda kaldığına ilişkin kanıt varsa, sonuçlar nominal yada ölçülen değerlere dayandırılabilir.

İç-akış testleri için, yarı durağan testler için açıklanan, benzer bir örnekleme sistemi uygundur(ancak bu durumda eski çözeltilerin ölçümü uygulanamaz). Ancak test süresi yedi günden daha fazla ise, ilk hafta içinde test konsantrasyonlarının kararlı kaldığını göstermek için örnekleme ortamlarının sayısını artırmak (örneğin üç grup ölçüm) önerilebilir.

Örneklerin filtrelenmesi (0.45 mikronluk filtre ile) yada santrifüj edilmesi gerekebilir. Ancak ne santrifujleme nede filtreleme biyolojik olarak yararlanılabilir olmayan kısmı biyolojik olarak yararlanılabilir olan kısımdan ayırmak için tamamen uygun olmadığı durumda, örnekler bu işlemlere tabi tutulmayabilir.

Test boyunca çözünmüş oksijen, pH ve sıcaklık bütün test kaplarında ölçülmelidir. Toplam sertlik, bazlık ve tuzluluk (gerekli ise,) kontrolde ve en yüksek derişime sahip tankta ölçülmelidir. En az, çözünmüş oksijen ve tuzluluk (eğer gerekli ise) 3 kez ölçülmelidir. (Testin başında ortasında ve sonunda). Yarı durağan testlerde, çözünmüş oksijenin daha sık tercihen suyun her yenilenmesinin başında ve sonunda veya en az haftada birkez ölçülmesi tercih edilir. İç-akış testlerinde pH, haftada en az birkez ve yarı durağan testinde her su yenilemesinin başında ve sonunda ölçülmelidir. Sıcaklık en azından bir test kabında tercihen sürekli olarak kontrol edilmelidir.

1.7.5. Gözlemler

1.7.5.1. Embriyonik gelişim evresi

Test maddesinin maruz kalmanın başlangıcındaki embriyonik evre (gastrula evresi) mümkün olduğu kadar kesin bir şekilde doğrulanmalıdır. Bu, korunmuş ve temizlenmiş numune bir yumurta aracılığı ile gerçekleştirilebilir. Embriyonik hallerin açıklaması ve gösterimi için literatüre başvurulmalıdır.(2)(5)(10)(11).

1.7.5.2. Yumurtadan çıkma ve yaşama

Yumurtadan çıkma ve yaşama için gözlemler en azından günlük olarak yapılmalıdır ve sayılar kaydedilmelidir. Testin başlangıcında daha sık ölçümlerin gerçekleştirilmesi gerekebilir(ilk 3 saat içinde 30 dakikada bir), çünkü bazı durumlarda yaşam zamanları ölüm sayısından daha önemlidir. (özellikle akut toksik etkiler olduğunda). Ölü larvalar ve embriyolar çok kolay bozunduklarından dolayı görülür görülmez ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Ölü larvalar ve embriyolar uzaklaştırılırken diğer yumurtalar çok hassas ve kırılgan oldukları için zarar vermemek için mümkün olduğu kadar dikkatli olunmalıdır.

Ölüm için yaşam evresine göre değişen ölçütler:
-yumurtalar için: özellikle erken yaşam evresinde protein çökmesi ve koagülasyonu sonu renklenmede kayıp ve yarı saydamlık kaybı ve beyaz saydam görünüme neden olur.

-embriyolar için: vücut hareketi kaybı yada kalp atışı durması ve/veya normal embriyoları yarısaydam olan embriyolar için saydam görünümün kaybolması
-larvalariçin: hareketsizlik ve/veya solunum hareketinin durması ve/veya kalp atışının durması, merkezi sinir sisteminde beyaz saydam renklenme ve/veya mekanik uyarıya cevap yetisinin kaybı.

1.7.5.3. Anormal görünüm

Anormal vücut görünümü ve/veya pigmentleşme gösteren larvaların sayısı ve vitellüs kesesi adsorpsiyon evresi testin süresine göre uygun aralıklarda kaydedilmelidir ve anormalliğin doğası açıklanmalıdır. Anormal embriyo ve larvalar doğal olarak gerçekleşebilir ve bazı türlerde kontrollerin farklı yüzde seviyelerinde olabilir. Anormal görünümlü hayvanlar test kaplarından ölüm halinde uzaklaştırılmalıdır.

1.7.5.4. Anormal davranış

Aşırı solunum, eşgüdümsüz yüzme, tipik pasiflik gibi anomaliler testin süresine göre uygun aralıklarda kaydedilmelidir. Bu etkilerin miktarını belirlemek zor olsa da, gözlendiklerinde ölüm oranı verilerinin yorumlanmasına ve maddenin toksik etkisinin mekanizmasını anlamaya yardımcı olur.

1.7.5.5. Uzunluk

Testin sonunda tek tek uzunluklarının ölçülmesi önerilir, standart, ya da toplam uzunluk kullanılabilir. Ancak eğer kuyruk, yüzgeç çürümesi olmuşsa standart uzunluklar kullanılabilir. Genel olarak, iyi yürütülmüş bir testte, tekrar deneyleri arasında uzunluk için değişkenlik katsayısı kontroller için ≤%20 olmalıdır.

1.7.5.6. Ağırlık

Testin sonunda tek tek ağırlıklar ölçülmelidir. Kuru ağırlıklar (24 saat 60 C de) ıslak ağırlıklara(kurutma kağıdı ile kurutulmuş) tercih edilir. Genel olarak, iyi yürütülmüş bir testte, tekrar deneyleri arasında ağırlık için değişkenlik katsayısı kontroller için ≤%20 olmalıdır.
Bu gözlemler istatistiksel analiz için aşağıdaki bazı verilerin ya da bütün verilerin elde edilmesi ile sonuçlanır.
-toplamsal ölüm oranı
-testin sonunda sağlıklı larva sayısı
-yumurtadan çıkma başlangıç ve bitiş zamanı (her bir tekrar deneyinde 90% yumurtadan çıkma)
-her gün yumurtadan çıkan larva sayısı
-testin sonunda hayatta kalan hayvanların uzunluk ve ağırlıkları
-anormal görünümdeki ve bozulmuş larva sayısı
-anormal davranış gösteren larva sayısı

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Bu test deneysel anlamda ciddi değişime uğrayabildiği (örneğin test bölmelerinin sayısı, test konsantrasyonlarının sayısı, döllenmiş yumurtaların sayısı gibi) için bir uzman istatistikçinin hem test tasarımında hem de sonuçların yorumlanmasında bulunması önerilir. Test tasarımında bulunan tercihler açısından, yardımcı istatistiki işlem burada verilmemiştir.

Eğer LOEC, NOECler hesaplanacaksa, her bir tekrar deney seti için değişiklik analizi ANOVA (Analysis of Variance) ya da olasılık tablo prosedürleri kullanılarak analiz edilmelidir. Her bir konsantrasyonda testler ve kontroller arasında çoklu bir karşılaştırma yapabilmek için, Dunnet yöntemi kullanışlı olabilir(12)(13). Diğer kullanışlı örnekler ayrıca mevcuttur.(14)(15) ANOVA veya diğer prosedürler kullanarak belirlenebilen etkinin büyüklüğü hesaplanmalı ve rapor edilmelidir. 1.7.5.6'da listelenen tüm gözlemlerin ANOVA kullanarak istatistikî analiz için uygun olmadığı not edilmelidir. Örneğin toplam ölüm oranı ve sağlıklı larva sayısı istatistiksel ihmal birimi yöntemleri kullanarak analiz edilebilir.

Eğer LC/EC_X oranı hesaplanacaksa (a) biçimsel eğri gibi uygun eğriler ilgilenilen veriler en düşük kareler ve doğrusal olmayan en küçük kareler yöntemleri gibi istatistikî analiz yöntemlerine uydurulmalıdır. Eğriler ilgilenilen LC/ECx ve onun standart hatasının hesaplanabileceği şekilde parametrelenmelidir. Bu LC/ECx çevresindeki güven aralıklarının hesabını kolaylaştırır. Farklı güven sınırlarını seçmek için iyi sebepler yoksa iki taraflı 95% güven yinelenmelidir. Uygunlaştırma prosedürü bunun yokluğunun önemini değerlendirmek için bir araç sağlar. Uyumlaştırmak için grafiksel yöntemlerden yararlanılabilir. 1.7.5.6'de listelenen gözlemlerin regresyon analizi mümkündür.

2.2. Sonuçların yorumlanması

Sonuçlar, ölçülen toksik madde konsantrasyonları analitik yöntemin tayin sınırlarına yakın seviyelerde gerçekleşiyorsa dikkatle yorumlanmalıdır. Maddenin sudaki çözünürlüğünün üstündeki konsantrasyon değerleri ile elde edilen sonuçlar dikkatle yorumlanır.

2.3. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir.

2.3.1. Test maddesi

- Fiziksel özellikler ve ilgili olduğunda fizikokimyasal özellikler
- Saflık ve test maddesinin miktar tayini için kullanılan analitik yöntem ile birlikte kimyasal tanımlama verisi

2.3.2. Test türleri

- Bilimsel adı, ırk, kaynak, yapılan elleçleme, balık ebeveynlerinin sayısı (testte istenen yumurta sayısını sağlamak için kaç tane dişi balık kullanıldığı), döllenen yumurtaların toplanması için kullanılan yöntem.

2.3.3. Test koşulları

- Kullanılan test prosedürü i.-akış ya da yarı durağan, döllenme süresinden teste başlamak için geçen süre, yükleme vs)
- Işıklandırma periyodu
- Test tasarımı (örneğin test bölmelerinin sayısı ve büyüklüğü, tekrar sayısı başına embriyo sayısı)
- Stok çözeltilerin hazırlanma yöntemi ve yenileme sıklığı (çözünürleştirici ajan, kullanıldığında konsantrasyonu verilmelidir.)
- Nominal test konsantrasyonları, ölçülen değerlerin ölçülme vasıtası ve test kaplarındaki standart sapması ve bunun hesaplandığı yöntem, eğer test maddesi suda çözünüyorsa ve konsantrasyonu test edilen konsantrasyondan düşükse, bulgular test maddesinin çözeltideki konsantrasyonuna dayandırılmalıdır.
- Seyreltme suyunun karakteristikleri: pH, sertlik, sıcaklık, çözünmüş oksijen derişimi, kalıntı klor seviyesi(eğer ölçüldüyse), toplam organik karbon, asılı katılar, test ortamının tuzluluğu ve yapılan diğer ölçümler
- Test kaplarındaki su kalitesi, pH, sertlik, sıcaklık ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu

2.3.4. Sonuçlar

- Maddenin kararlılığı ile ilgili olan ön çalışma sonuçları
- Kontrollerin test türlerinin kabul edilebilir yaşayabilirlik standardlarına uyumlu olduğunun kanıtı (Ek-II ve III)
- Embriyo ve larva evreleri için ölüm oranı ve yaşayabilirlik verileri ve tüm ölüm oranları ve yaşayabilirlik verileri
- Yumurtadan çıkma ve yumurtadan çıkan sayısı
- Uzunluk ve ağırlık verileri
- Varsa, morfolojik anormalliklerin açıklaması ve oranı
- Varsa, davranışsal etkilerin açıklaması ve oranı
- Verilerin istatistikî analiz teknikleri, ve ele alınma yöntemleri
- ANOVA kullanılarak analiz edilen testler için, p=0.05'te LOEC ve değerlendirilen her cevaptaki NOEC istatistiksel prosedürlerin açıklamasını ve hangi büyüklükte bir etkinin belirlenebildiğinin belirtisi ile birlikte
- Regresyon teknikleri ile analiz edilen testler, LC/ECx, ve güven aralıkları ve hesaplanması için kullanılan uyumlaştırma modelinin grafiği
- Test yönteminden gözlenen herhangi bir sapmanın açıklaması

3. KAYNAKLAR

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UKRing 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, pp 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

(Brachydaniorerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 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, pp 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, Minesota.

(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, pp 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rain bow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

(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, pp 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482–491.

(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, pp 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, Oncorhynchusmykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, 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, 33–41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

(18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 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, Minesota. Tech. Rep. No 05–88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510 -531.

TABLO 1A: TEST İÇİN ÖNERİLEN BALIK TÜRLERİ

TATLI SU
Oncorhynchus mykiss Gökkuşağı alabalığı (9)(16)
Danio rerio Zebrabalığı (7)(17)(18)
Cyprinus caprio Kaba sazan (8)(19)
Oryzias latipes japanese pirinçbalığı/Medaka (20)(21)
Pimephales promelas İribaş golyan balığı (8)(22)

TABLO 1B: KULLANILAN İYİ BELGELENMİŞ DİĞER BALIKLARIN ÖRNEKLERİ

TATLI SU	TUZLU SU
Carassius auratus ALTINBALIK(8) *Lepomis macrochirus* Büyük güneşbalığı (8)	*Menidia peninsulae* gümüşsırt (23)(24)(25) *Clupea harengus* Ringa (24)(25)
	Gadus morhua Morina (24)(25)
	Cyprinodon variegatus Aptal golyanbalığı (23)(24)(25)

Ek -I

Yeni yumurtadan çıkmış zebra balığı *(brachydanio rerio)* ve embriyolar için toksisite testinin performansı üzerine rehber

GİRİŞ

Zebra balıkları Hindistan'ın Coromandel sahilinde hızlı akan akıntılardan gelir. Bu balık yaygın kullanılan ve sazan ailesinden gelen bir akvaryum balığıdır ve bu balığın kültürü ve bakımı ile ilgili bilgiler tropikal balıklar hakkındaki standart kitaplarda bulunabilir. Biyolojisi ve balıkçılıkta kullanımı Laale tarafından kapsamlıca ele alınmıştır (1).

Balık çok nadiren 45 mm uzunluğu geçer. Vücudu 7–9 koyu mavi yatay şeritlerden oluşan bir silindir gibidir. Bu şeritler kuyruk ve kıç yüzgeçlerine doğru uzanır. Sırtı koyu yeşildir. Erkekleri dişilerine nazaran daha incedir. Dişileri daha gümüşümsü ve karınları özellikle yumurtlama dönemlerinden önce daha şiştir.

Yetişkin balıklar sıcaklık, pH, sertlikteki büyük dalgalanmalara dayanabilir. Ancak iyi kalitede yumurta üreten sağlıklı balıklar elde etmek için, en uygun koşullar sağlanmalıdır.

Yumurtlama sırasında, erkek dişinin peşinden dolanır ve yumurtalar dölleme için bırakılana kadar ona kafa atar. Ebeveynler tarafından yenilebilen şeffaf ve yapışkan olmayan yumurtalar, aşağı kısma düşer.
Yumurtlama ışıktan etkilenebilir. Eğer sabah ışığı yeterli ise, balık genellikle şafak vaktini takip eden erken saatlerde yumurtlar.
Dişi haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakır.

EBEVEYN BALIKLAR İÇİN ŞARTLAR, ÜREME VE ERKEN YAŞAM EVRELERİ

İstenilen yumurtlama zamanından 2 hafta önce uygun sayıda sağlıklı balık seçilir ve uygun bir su içine(Ek-4) atılır. Balık grubu testlerde kullanılan yumurtaları bırakmadan önce en azından 1 kere yemlenmelidir. Bu periyotta balık yoğunluğu litre başına 1 gram balığı geçmemelidir. Sudaki düzenli değişiklikler ya da arındırma sistemlerinin kullanımı yoğunluğun daha yüksek olmasını sağlar. Muhafaza tanklarındaki sıcaklık 25±2 °C'de tutulmalıdır. Balıklar örneğin uygun ticari yem, yeni yumurtadan çıkmış Arthemia, kironomoidler, defne, solucan gibi çok çeşitli yemlerle beslenmelidir.

Yumurtaların testte kullanımı için uygun, sağlıklı yumurta elde etmek için iki prosedür aşağıda özetlenmiştir.

i. Sekiz dişi ve 16 erkek 50 L su içeren ve doğrudan ışık ile temas etmeyen bir tanka alınır ve 48 saat boyunca mümkün olduğunca rahatsız edilmeden öyle bırakılır. Testin başlanıcından bir önceki gün öğleden sonra yumurtlama tablası akvaryumun dibine bırakılır. Yumurtlama tablası 5-7 cm yüksekliğinde ve 2-5 mm kaba genişlikte tabandan 10-30 mikronluk, tepede de 2-5 mm lik bir kaba ağa tutturulmuş bir iskelette oluşur. Bir sayıda bükülmemiş sicimlerden oluşan yumurtlama ağaçları iskeletin kaba ağına tutturulur. Balıklar karanlıkta 12 saat bırakıldıktan sonra yumurtlamayı başlatacak olan ışık açılır. Yumurtlamadan 2 ila 4 saat sonra, yumurtlama tablası ayrılır ve yumurtalar toplanır. Yumurtlama tablası balıkların yumurtaları yemesini engeller ve aynı zamanda yumurtaların daha kolay toplanmasını sağlar. Yumurtaları test için kullanılmadan önce balık grupları en az bir kez yumurtlamalıdır.

ii. Beş ila 10 erkek ve dişi balık istenilen yumurtlamadan 2 hafta önce barındırılır. 5–10 gün sonra, dişilerin karın bölgesi şişer ve üreme organı görülebilir hale gelir. Erkekte bu üreme organı yoktur. Yumurtlama ızgaralı bir yumurtlama tankında gerçekleştirilir. Tank seyrelme suyu ile doldurulur ve böylelikle ızgaranın üzerindeki su seviyesi 5-10 cm olur. Bir dişi ve 2 erkek balık istenilen yumurtlamadan bir gün önce tanka konulur. Su sıcaklığı azar azar ve havalandırma sıcaklığından 1 derece fazla olacak şekilde artırılır. Işık kapatılır ve tank mümkün olduğu kadar sakin bırakılır. 24 saat sonra, Balıklar ayrılır ve yumurtalar toplanır. Eğer bir dişiden daha büyük grupta yumurta gerekiyorsa, yeterli sayıda yumurtlama tankı paralel olarak kullanılabilir. Testten önce dişi balıkların bireysel üreme başarılarını kaydederek, çoğalma için en yüksek performanstaki dişiler seçilebilir.

Yumurtalar cam tüpler aracılığı (çapı 4 mm'den az olmayan) ile test kaparlına transfer edilir. Yumurtalara transferleri sırasında eşlik eden suyun miktarı mümkün olduğu kadar az olmalıdır. Sudan ağır olan yumurtalar tüpün dibine batar . Yumurtaların hava ile temas halinde olmamasına dikkat edilmelidir. Deney gruplarındaki yumurtaların mikroskopik incelemesinde ilk gelişim evresinde düzensizliklerin olmamasında dikkat edilmelidir. Yumurtaların enfeksiyon kapması engellenmelidir.

Yumurtların ölüm hızı, döllenmeden sonraki ilk 24 saat içinde en fazladır. Bu periyot boyunca %5 ila %40 arasındaki ölümlülük görülür. Yumurtların başarısız döllenmesi ve yetersiz gelişim sonucu bozunur. Her bir grup yumurtanın kalitesi dişi balığa bağlıdır ve bazı dişiler değişmez olarak iyi yumurta meydana getirirken bazıları hiç getiremez. Gelişim hızı ve yumurtadan çıkma hızı bir gruptan diğerine değişir. Başarılı döllenmiş yumurtaların hayatta kalması yüksektir.(normal olarak %90'dan fazla) 25 ^{o}C'ta yumurtalar döllenmeden sonra 3-5 gün içinde kuluçkayı tamamlar.

Hisaoka ve Battle tarafından embriyonik gelişim iyi açıklanmıştır. Yumurtaların ve kuluçka sonrası larvaların saydamlığı dolayısıyla, balıkların gelişimi takip edilebilir ve sakatlıklar gözlenebilir. Yumurtlamadan 4 saat sonra, döllenmemiş yumurtalar döllenmişlerden ayırt edilebilir. Bunun için, yumurtalar ve larvalar küçük hacimli test kaplarına konulur ve mikroskop altında çalışılır.

Erken yaşam evrelerine uygulanabilen test koşulları EK-II'de listelenmiştir. En uygun pH değerleri ve su sertliği değerleri 7.8 ve 250 mg/ $CaCO_3$ /L 'dir

HESAPLAMALAR VE İSTATİSTİKLER

İki aşamalı bir yaklaşım önerilir. İlk önce, anormal gelişim ve kuluçka zamanı istatistiksel olarak analiz edilir. Sonra, bu parametrelere hiçbir olumsuz etki göstermeyen derişimler belirlenir ve vücut boyu istatistiksel olarak hesaplanır. Bu yaklaşım toksinler küçük balıkları seçici olarak öldürdüğü, kuluçka zamanını geciktirdiği ve büyük sakatlıklar oluşturduğu ve tartışmalı uzunluk değerlerine neden olduğu için tavsiye edilir. Daha ötesi test istatistiğini sağlayacak şekilde muamele başına kabaca aynı sayıda balık olacaktır.

LC_{50} VE EC_{50} TESPİTİ

Hayatta kalan yumurta ve larvaların yüzdesi kontrollerdeki ölüm oranları için Abbot formülü ile uyumlu şekilde düzeltilir ve hesaplanır.

$$P=100-(\frac{C-P^1}{C}x100)$$

Burada P= düzeltilmiş yüzde yaşayabilirlik
P^1= testte gözlenen yüzde yaşayabilirlik
C= testteki yüzde yaşayabilirlik

Eğer mümkünse LC_{50} testin sonunda uygun bir yöntemle belirlenir.

EC_{50} istatistiğinde morfolojik anomaliler dahil edilmesi isteniyorsa, buna ilişkin rehber Stephan(5)'dan elde edilebilir

LC_{50} VE EC_{50} TESPİTİ

Yavru balık ve yumurta testinin hedefi sıfır olmayan konsantrasyonları kontrol ile karşılaştırmak yani LOEC'yi belirlemektir. Bu yüzden çoklu karşılaştırma prosedürleri kullanılabilir. (6)(7)(8)(9)(10).

4. KAYNAKLAR

(1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 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, pp 311.
(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp 173-181.
(4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 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, pp 69 -81.
(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096 -1121.
(7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 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, pp 103–117.
(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp 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.

Ek-II

Önerilen test türleri için test koşulları, zaman ve yaşayabilirlik ölçütleri

TÜRLER	SICAKLIK (° C)	TUZLULUK (%)	IŞIKLI PERİYOT (Saat)	EVRELERİN SÜRESİ (gün)		TESTİN TİPİK SÜRESİ	KONTROLÜN YAŞAYABİLİRLİĞİ (EN AZ YÜZDE) Başarı ile yumurtadan çıkan Ön yumurtadan çıkış	
				Embriyo	Yumurtadan yeni çıkmış embriyo			
TATLI SU								
Brachydanio rerio Zebrabalığı	25 ± 1	-	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 5 günlük kuluçka sonrası evresine kadar (8-10 gün)	80	90
Oncorhynchus mykiss gökkuşağıalabalığı	10 ± 1(1) 12 ± 1(2)	-	0 (a)	30 – 35	25 – 30	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 20 günlük kuluçka sonrası evresine kadar (50-55 gün)	66	70
Cyprinus carpio Bayağı sazan	21 – 25	-	12 – 16	5	> 4	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 4 günlük kuluçka sonrası evresine	80	75

						kadar (8-9 gün)		
Oryzias latipes Japon pirinç balığı /Medaka	24 ± 1(1) 23 ± 1(2)	- -	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa	80	80
		-	16	4 – 5	5	süreden 5 günlük	60	70
Pimephales promelas İribaş golyan balığı	25 ± 2					kuluçka sonrası evresine kadar (13-16 gün) Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 4 günlük kuluçka sonrasıevresine kadar (8-9 gün)		

(1) Embriyo için (2) Larva için (a) Denetlenmeleri hariç yumurtadan çıktıktan bir hafta sonrasına kadar embriyo ve larva için karanlık

Ek-III

İyi belgelenmiş türler için önerilen test türleri için test koşulları, zaman ve yaşayabilirlik ölçütleri

TÜRLER	SICAKLIK (°C)	TUZLULUK (0/100)	IŞIKLANDIRMA PERİYODU (Saat)	EVRELERİN SÜRESİ (gün)		EMBRİYO VE ERKEN LARVA DÖNEMİNİN TİPİK SÜRESİ	KONTROLÜN YAŞAYABİLİRİLİĞİ (en az %)	
				EMBRİYO	ERKEN LARVA TESTİ		Kuluçka Başarısı	Kuluçka Sonrası
TATLISU								
Carassius auratus Japon balığı	24 ± 1	–	–	3 – 4	> 4	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 4günlük kuluçka sonrası evresine kadar (7 gün)	–	80
Leopomis macrochirus Ay balığı	21 ± 1	–	16	3	> 4	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 4günlük kuluçka sonrasıevresine kadar (7 gün)	–	75
TUZLUSU								
Menidia peninsulae (Tidewater silverside)	22 - 25	15 – 22	12	1.5	10	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 5 günlük kuluçka sonrasıevresine kadar 6-7 gün)	80	60
Clupea harengus (Herring)	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 3 günlük kuluçka sonrasıevresine kadar (23-27 gün)	60	80
Gadus morhua Cod	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Döllenmeden sonra mümkün olan en kısa süreden 3 günlük kuluçka sonrasıevresine kadar (18 gün)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15 – 30	12	–	–	Döllenme-den sonra mümkün olan en kısa süreden 4/7 günlük kuluçka sonrası evresine kadar (28 gün)	> 75	80

Ek-IV

Kabul edilebilir seyrelme suyunun bazı kimyasal özellikleri

MADDE	KONSANTRASYON
Partikül madde	<20 mg/L
Toplam organik karbon	<2 mg/L
İyonlaşmamış amonyak	<1 µg/L
Kalıntı klor	<10 µg/L
Toplam fosforlu organik pesitisit	<50 ng/L
Toplam klorlu organik pestisit artı poliklorlu bifeniller	<50 ng/L
Toplam organik klor	<25 ng/L

C.16 BAL ARILARI-AKUT AĞIZDAN (ORAL) TOKSİSİTE TESTİ

1. YÖNTEM

Bu akut toksisite testi OECD TG 213(1998) test yöntemi ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu toksisite testi yetişkin işçi arılara bitki koruma ürünleri ve diğer kimyasalların ağızdan akut toksisitesini belirlemek için tasarlanan bir laboratuvar metodudur.

Maddelerin toksik karakterini hesaplama ve değerlendirilmesinde, örneğin arıların belirli bir kimyasala maruz kalması olasıysa balarılarının akut ağızdan toksisitenin belirlenmesi gerekebilir. Akut ağızdan toksisite testi pestisitler ve diğer kimyasalların arılara karşı olan toksisitesini belirlemek için yürütülür. Bu testin sonuçları ilave değerlendirme gereğini açıklamak için kullanılmalıdır. Özel olarak, bu yöntem pestisitlerin arılara olan zararlarını tespit için kullanılan ve yarı-alan ve alan toksisite deneylerine dayanan programlarda kullanılabilir (1). Pestisitler aktif maddeler olarak ya da formüle edilmiş ürünler olarak test edilebilir.

Test prosedürünün kesinliğini test etmek için ve arıların duyarlılığını doğrulamak için toksik bir standart kullanılmalıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Akut ağızdan toksisite: Test maddesinin tek bir dozunun ağızdan verilmesini takiben maksimum 96 saatlik periyotta oluşan olumsuz etkilerdir.

Doz: Test maddesinin tüketilen miktarıdır. Doz test hayvanı başına (µg/arı) uygulanan test maddesinin kütlesi (µg) olarak ifade edilir. Her bir arı için gerçek doz arıların hepsi birlikte beslendiği için hesaplanamaz ancak ortalama bir doz belirlenebilir. (toplam tüketilen test maddesi/ bir kovandaki arıların sayısı)

LD_{50} (Ortanca ölümcül doz) Ağızdan = Ağız yolu ile verildiğinde hayvanların %50'sinin ölümüne neden olan ve istatistiksel olarak türetilen maddeye ait tekil dozdur. LD_{50} değeri arı başına düşen µg cinsinden test maddesi olarak ifade edilir. Pestisitler için, test maddesi ya aktif bir madde olabilir ya da aktif maddelerden bir ya da birkaçını içeren formüle edilmiş bir ürün olabilir.

Ölüm : Hayvan tamamen hareketsiz ise ölü olarak kayıt edilir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Yetişkin işçi arılar *(apis mellifera)* sukroz çözeltisi içinde dağıtılmış, farklı dozlarda test maddesine maruz bırakılır. Kontrol arıları test maddesi içermeyen aynı beslenmeye tabi tutulur. Ölüm günlük olarak en azından 48 saatte kaydedilir ve kontrol edilir ve kontrol değerleri ile karşılaştırılır. Eğer ölüm hızı 24 saat ve 48 saatlik sürelerde artıyor ancak ölüm oranı kabul edilebilir seviyede kalıyorsa, yani $\leq$ %10, testin süresi maksimum 96 saate çıkarılabilir. 24 saat ve 48 saatlik LD_{50} değerlerini test uzatıldığı takdirde 72 saat ve 96 saatlik sürede LD_{50} değerlerini hesaplamak için sonuçlar analiz edilir.

1.4. Testin geçerliliği

Testin geçerli olması için aşağıdaki şartlar uygulanır:

- Toplam kontrollerin sayısının ortalama ölüm oranı testin sonunda %10'u geçmemelidir.
- Toksik standardın LD_{50} değerinin belirlenen aralıkta olması

1.5. Test yönteminin tanımlanması

1.5.1. Arıların toplanması

Aynı ırktan gelen, aynı yaşta, aynı besleme durumunda vs. genç işçi arılar kullanılmalıdır. Arılar yeterince beslenmiş, sağlıklı, bilinen fizyolojik durumda ve bilinen geçmişe sahip hastalıklı olmayan kraliçe kolonisinden elde edilmelidir. Arılar sabah alıp kullanılabilir ya da akşam toplanıp bir sonraki günkü test için saklanabilir. Yavru arı içermeyen peteklerden toplanan arılar uygundur. İlkbaharın başında ya da sonbaharın sonunda arılar değişik bir fizyolojide olduğu için bu dönemde arı toplanmasından kaçınılmalıdır. Eğer testler ilkbaharın başında ya da sonbaharın sonunda gerçekleştirilecekse, arılar inkübatöre alınır 1 hafta süreyle arı ekmeği ve sukroz çözeltisi ile beslenir (taraktan toplanan polen) . Antibiyotik, anti-varroa ürünleri gibi kimyasal maddelerle muamele edilen arılar son muameleden dört hafta geçene dek toksisite testleri için kullanılmamalıdır.

1.5.2. Barınma ve besleme koşulları

Temizlemesi kolay ve iyi havalandırılmış kovanlar kullanılır. Paslanmaz çelik, tel ağ, plastik ve kullan-at türü ağaç gibi herhangi bir uygun malzeme kafeslerde kullanılabilir. Kovan başına 10 arılık gruplar tercih edilir. Test kovanlarının büyüklüğü arıların sayısı için uygun ve yeterince alan içerecek şekilde olmalıdır.

Arılar 25 ±2 °C sıcaklıkta ve karanlıkta deney odalalarında saklanmalıdır. Normal olarak %50–70 olan bağıl nem test süresince kaydedilmelidir. Muamele ve gözlemleri içeren elleçleme prosedürleri gün ışığında yapılabilir. 500 g/L (50% w/v)son derişime sahip sükroz çözeltisi besin olarak kullanılmalıdır. Verilen dozlardan sonra, besin *ad-libitum* olarak sağlanmalıdır. Besleme sistemi her bir kafeste besin alımını kaydedecek şekilde olmalıdır.(bölüm 1.6.3.1'e bakınız.) Cam tüp (yaklaşık 50 mm uzunluğunda ağız kısmı 10 mm genişliğinde ve alt kısmı 2 mm çapına kadar daralan) kullanılabilir.

1.5.3. Arıların hazırlanması

Toplanan arılar deney odasına rast gele dağıtılmış test kovanlarına rasgele yerleştirilir. Arılar testin başlangıcından önce 2 saat kadar aç bırakılabilirler. Arıların hepsinin testin başlangıcında bağırsak içeriklerinin aynı olması için besinsiz bırakılmaları önerilir. Test başlamadan önce ölmek üzere olan arılar alınmalı ve sağlıklı olanları ile değiştirilmelidir.

1.5.4. Dozun hazırlanması

Test maddesinin su ile karışır olduğu durumlarda madde %50'lik sukroz çözeltisinde dağıtılabilir. Teknik ürünler ve sudaki çözünürlükleri düşük olan maddelerde, organik çözücü, emülsiyon oluşturucu yada arılar için düşük toksisiteye sahip dağıtıcılar (örneğin aseton,

dimetilformamit, dimetilsülfoksit gibi taşıyıcılar) kullanılabilir. Kullanılan taşıyıcının konsantrasyonu test maddesinin çözünürlüğüne bağlıdır ve test edilen bütün madde konsantrasyonları için aynı olmalıdır. %1'lik taşıyıcı konsantrasyonu uygundur ve bu değer aşılmamalıdır.

Uygun kontrol çözeltileri hazırlanmalı (yani test maddesini çözmek için çözücü veya dağıtıcı kullanıldığı zaman).İki ayrı kontrol grubu kullanılmalıdır: Sudaki çözelti ve kullanılan doz ayarlama çözeltilerinde kullanılan konsantrasyonda çözücü/taşıyıcı ile sükroz çözeltisidir.

1.6. İşlem

1.6.1. Test ve kontrol grupları

Test edilen doz sayısı ve tekrarlar LD_{50}'nin %95'lik güven aralığında belirlenmesindeki istatistiksel ölçütleri sağlamalıdır. Normal olarak test için LD_{50} aralığını kapsayan ve aralarında 2.2 faktörünü geçmeyecek şekilde değişen geometrik seri halinde 5 doz gereklidir. Ancak toksisite eğrisine (doz oranına karşı-ölüm oranı) göre seyreltme oranı ve konsantrasyonların sayısı belirlenmelidir ve sonuçların analizinde seçilen istatistikî yöntem dikkate alınmalıdır. Bir aralık bulma testi uygun dozdaki konsantrasyonların bulunmasını sağlar.

10 arıdan oluşan en az 3 tekrar her bir konsantrasyon ile doz ayarlanmalıdır. 10 arıdan oluşan en az 3 kontrol grubu test grubuna paralel olarak yürütülmelidir. Kullanılan çözücü/taşıyıcılar içinde kontrol grupları dâhil edilmelidir (Bakınız bölüm 1.5.4).

1.6.2. Toksik standart

Bir toksik standat test serileri içinde yer almalıdır. Beklenen LD_{50} değerini kapsayacak en az 3 doz seçilmelidir. Her test dozunda her biri 10 arı içeren en az 3 tekrar kovanı kullanılmalıdır. Tercih edilen toksik standart rapor edilen 24 saatlik ağızdan LD_{50} değeri 0.10–0.35 µg/arı olan dimetoat'tır. Ancak beklenilen doz cevabı doğrulayacak verinin bulunduğu diğer toksik standartlarda kullanılabilir (örneğin, Parathion).

1.6.3. Maruz kalma

1.6.3.1. Dozların uygulanması

Her test grubu arısı uygun derişimde test maddesi içeren %50'lik sukroz çözeltisinin100–200 µl'si ile temin edilmelidir. Düşük çözünürlükteki, formülasyonunda düşük konsantrasyonlu ya da düşük toksisitesi olan ürünler için ise daha büyük bir hacim gereklidir aynı zamanda daha yüksek yüzdeli sukroz çözeltileri kullanılmalıdır. Grup başına tüketilen besin izlenmelidir. Tüketildikten sonra (genellikle 3–4 saat içinde), besleyici kap kovandan alınmalı ve sadece sukroz çözeltisi içeren bir başkası ile değiştirilmelidir. Sukroz çözeltileri *ad-libitum* olarak sağlanmalıdır. Bazı bileşikler için, test dozunun yüksek konsantrasyonlarda reddedilmesi çok az besin tüketilmesine ya da hiç besin tüketilmemesine neden olabilir. Maksimum 6 saat sonra, tüketilmeyen besin sadece sükroz çözeltisi ile değiştirilmelidir. Tüketilen besin hesaplanmalıdır (Hacim/ kalan besin ağırlığının ölçümü ile).

1.6.3.2. Süre

Testin süresi test çözeltisi sukroz çözeltisi ile değiştirildikten sonra tercihen 48 saattir. Eğer ölüm oranı ilk 24 saatte %10 'dan fazla artmaya devam ederse, ilk test süresi kontrolün ölüm oranı %10 geçmeyecek şekilde 96 saate çıkarılmalıdır.

1.6.4. Gözlemler

Ölüm, testin başlangıcından 4 saat sonra ve 24 saat ve 48 saatte kaydedilir (dozu verdikten sonra). Eğer daha uzun bir gözlem süresi gerekiyorsa kontrolün ölüm oranı %10 geçmeyecek şekilde maksimum 96 saate kadar 24 saatlik aralıklarla daha ileriki tespitler yapılmalıdır.
Grup başına tüketilen besin miktarı hesaplanmalıdır. Verilen 6 saatlik sürede muamele edilen ve muamele edilmemiş besinin tüketim hızlarının karşılaştırılması muamele edilen besinin uygunluğu hakkında bilgi sağlayabilir. Test süresi içinde gözlenen bütün beklenmeyen davranış etkileri kaydedilmelidir.

1.6.5. Sınır testi

Bazı durumlarda (test maddesinin düşük toksisiteye sahip olduğu beklenen durumlarda) LD_{50} 'nin bu değerden daha yüksek olduğunu göstermek için 100 µg/ arı kullanarak bir limit testi uygulanmalıdır. Test dozu için 3 tekrar test grubu; bağıl kontroller, tüketilen besin miktarının değerlendirilmesi, toksik standartın kullanımını içeren aynı prosedür kullanılmalıdır. Eğer ölüm gerçekleşirse tam bir çalışma yürütülmelidir. Eğer alt ölümcül etkiler gözlenirse (bakınız 1.6.4) bunlar kaydedilmelidir.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Veriler

Veriler, her bir muamele grubu, kontrol ve toksik standart gruplar, kullanılan arı sayısı, her gözlem zamanında izlenilen ölüm, ters davranış gösteren arı sayısını gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Ölüm verileri uygun istatistiksel yöntemlerle analiz edilir. (istatistiksel ihmal birimi analizi, binom olasılığı, ortalama)(3)(4). Doz-cevap eğrisi önerilen her bir gözlem zamanında çizilir ve %95 güven aralığında ortalama ölüm dozları(LD_{50}) ve eğrinin eğimi hesaplanır. Abbott düzeltmesi kullanılarak ölüm kontrolü üzerinde düzeltmeler yapılabilir.(4)(5). Muamele edilen besinin tümüyle tüketilmediği durumlarda, grup başına tüketilen test maddesi dozu belirlenmelidir. LD_{50} arı başına düşen µg cinsinden test maddesi olarak ifade edilir.

2.2. Test raporu

Test raporu aşağıdakileri içermelidir.

2.2.1. Test maddesi

- Fiziksel doğası ve ilgili fizikokimyasal özellikler (örneğin sudaki kararlılık, buhar basıncı)
- Yapısal formül, saflık gibi özellikleri içeren kimyasal tanımlama verileri (pestisitler için aktif maddelerin tanımı ve derişimi)

2.2.2. Test türleri

- Bilimsel isim, ırk, yaklaşık yaş (hafta), toplama yöntemi, toplama tarihi
- Sağlık, herhangi bir yetişkin hastalığı, herhangi bir ön işlem gibi test arılarının toplanması için kullanılan koloniler hakkında bilgi

2.2.3. Test şartları

- Deney odasının sıcaklık ve bağıl nemi
- Tür, büyüklük ve kovan maddesi gibi barınma koşulları
- Test ve stok çözeltilerinin hazırlanma yöntemi (kullanıldığında, çözücü ve konsantrasyonu)
- Test tasarımı, kullanılan konsantrasyonlar ve sayısı, kontrol sayısı, her bir test konsantrasyonu ve kontrol için tekrar kovanlarının sayısı ve her kovandaki arı sayısı
- Test tarihi

2.2.4. Sonuçlar

- Eğer yapıldıysa ön aralık bulma testinin sonuçları
- Ham veriler: her gözlem zamanında ve dozda ölüm
- Testin sonunda doz-cevap eğrilerinin grafiği
- Her bir test maddesi ve toksik standart için önerilen gözlem zamanında %95 güven aralığında LD50 değerleri
- LD50 'nin bulunmasında kullanılan istatistiksel işlem
- Kontroldeki ölüm oranı
- Arıların beklenemeyen davranışı, muamele edilen ve edilmeyen gruplardaki besin tüketim hızı gibi besindeki gözlenen ya da ölçülen diğer biyolojik etkiler
- Test işlemlerinden herhangi bir sapma ve diğer ilgili bilgiler

3. KAYNAKLAR

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision -Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March 1993.

(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, 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 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, 265-267.

C.17 BAL ARILARI-AKUT TEMAS TOKSİSİTE TESTİ

1. YÖNTEM

Bu akut toksisite testi OECD TG 214 (1998) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu toksisite testi yetişkin işçi arılara bitki koruma ürünleri ve diğer kimyasalların akut temas toksisitesini değerlendirmek için tasarlanan bir laboratuvar yöntemidir.

Maddelerin toksik karakterinin belirlenmesinde ve değerlendirilmesinde, örneğin arıların belirli bir kimyasala maruz kalması dolayısıyla bal arılarının akut temas toksisitesinin belirlenmesi gerekebilir. Akut temas toksisite testi pestisitler ve diğer kimyasalların arılara karşı olan ve doğal yapısından kaynaklanan toksisitelerini belirlemek için yürütülür. Bu testin sonuçları ilave değerlendirmeler için ihtiyaçları belirlemek için kullanılmalıdır. Özel olarak, bu yöntem pestisitlerin arılara olan zararlarını tespit için kullanılan ve yarı-alan ve alan toksisite deneylerine dayanan programlarda kullanılabilir (1). Pestisitler aktif maddeler olarak ya da formüle edilmiş ürünler olarak test edilebilir.

Test prosedürünün kesinliğini test etmek için ve arıların duyarlılığını doğrulamak için bir toksik standardt kullanılmalıdır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Akut temas toksisitesi: Test maddesinin tek bir dozunun bölgesel olarak verilmesini takiben maksimum 96 saatlik periyotta oluşan olumsuz etkilerdir.

Doz: Test maddesinin uygulanan miktarıdır. Doz test hayvanı başına (µg/arı) düşen test maddesinin kütlesi (µg) olarak ifade edilir.

LD_{50} (Ortanca ölümcül doz) = Temasla uygulandığında hayvanların %50'sinin ölümüne neden olan ve istatistiksel olarak türetilen maddeye ait tek dozdur. LD_{50} değeri arı başına düşen µg cinsinden test maddesi olarak ifade edilir. Pestisitler için, test maddesi ya aktif bir madde olabilir ya da aktif maddelerden bir yada birkaçını içeren formüle edilmiş bir ürün olabilir.

Ölüm: Hayvan tamamen hareketsiz ise ölü olarak kayıt edilir.

1.3. Test yönteminin ilkesi

Yetişkin işçi arılar *(apis mellifera)* uygun bir dağıtıcı içinde dağıtılmış farklı dozlarda test maddesine göğüs boşluğundan doğrudan uygulama (damla) ile maruz bırakılır. Test süresi 48 saattir. Eğer ölüm hızı 24 saat ve 48 saatlik sürelerde artıyor ancak kontrol ölümleri kabul edilebilir seviyede kalıyorsa, yani $\leq$ %10, testin süresini maksimum 96 saate çıkarmak uygun olur. Ölüm günlük olarak kaydedilir ve kontrol değerleri ile karşılaştırılır. 24 saat ve 48 saatlik LD_{50} değerlerini test uzatıldığı takdirde 72 saatlik ve 96 saatlik LD_{50} değerlerini hesaplamak için sonuçlar analiz edilir.

1.4. Testin geçerliliği

Testin geçerli olması için aşağıdaki şartlar uygulanır:

- Toplam kontrollerin sayısının ortalama ölüm oranı testin sonunda %10'u geçmemelidir.
- Toksik standardın LD_{50} değeri belirlenen aralıkta olması

1.5. Test yönteminin tanımlanması

1.5.1. Arıların toplanması

Aynı ırktan gelen, aynı yaşta, aynı besleme durumunda vs. genç işçi arılar kullanılmalıdır. Arılar yeterince beslenmiş, sağlıklı, bilinen fizyolojik durumda ve bilinen geçmişe sahip hastalıklı olmayan kraliçe kolonisinden elde edilmelidir.Arılar sabah alıp kullanılabilir ya da akşam toplanıp bir sonraki günkü test için saklanabilir. Yavru arı içermeyen peteklerden toplanan arılar uygundur. İlkbaharın başında ya da sonbaharın sonunda arılar değişik bir fizyolojide olduğu için bu dönemde arı toplanmasından kaçınılmalıdır. Eğer testler ilkbaharın başında ya da sonbaharın sonunda gerçekleştirilecekse, arılar inkübatöre alınır 1 hafta süreyle arı ekmeği ve sukroz çözeltisi ile beslenir (taraktan toplanana polen). Antibiyotik, anti-varroa ürünleri gibi kimyasal maddelerle muamele edilen arılar son muameleden dört hafta geçene dek toksisite testleri için kullanılmamalıdır.

1.5.2. Barınma ve besleme koşulları

Temizlemesi kolay ve iyi havalandırılmış kovanlar kullanılır. Paslanmaz çelik, tel ağ, plastik ve kullan-at türü ağaç gibi herhangi bir uygun malzeme kafeslerde kullanılabilir. Kovan başına 10 arılık gruplar tercih edilir. Test kovanlarının büyüklüğü arıların sayısı için uygun ve yeterince alan içerecek şekilde olmalıdır.

Arılar 25 ±2 °C sıcaklıkta ve karanlıkta deney odalarında saklanmalıdır. Normal olarak %50–70 olan bağıl nem test süresince kaydedilmelidir. Muamele ve gözlemleri içeren elleçleme prosedürleri gün ışığında yapılabilir. 500g/L (50% w/v)son derişime sahip sukroz çözeltisi besin olarak kullanılmalıdır. Verilen dozlardan sonra, besin *ad-libitum* olarak sağlanmalıdır. Besleme sistemi her bir kafeste besin alımını kaydedecek şekilde olmalıdır. Cam tüp (yaklaşık 50 mm uzunluğunda ve ağız kısmı 10 mm genişliğinde ve alt kısmı 2 mm çapına kadar daralan bir cam tüp) kullanılabilir.

1.5.3. Arıların hazırlanması

Toplanan arılar deney odasına alınmadan önce test maddesinin uygulaması için karbondioksit ve azot ile anesteziye tabi tutulabilir. Kullanılan anestezik ve maruz kalma zamanı en aza indirilmelidir. Test başlamadan önce ölmek üzere olan arılar alınmalı ve sağlıklı olanları ile değiştirilmelidir.

1.5.4. Dozun hazırlanması

Uygulanacak test maddesi bir taşıyıcı içinde çözelti olarak uygulanır, yani, organik çözücü veya ıslatıcı ajanlı ıslak çözelti olacak şekilde uygulanmalıdır. Organik çözücü olarak aseton tercih edilir ancak arılara olan toksisitesi düşük olan başka organik çözücülerde (örneğin, dimetilformamit, dimetilsülfoksit) kullanılabilir. Suda dağıtılarak formüle edilen ürünler için

yüksek polarlıkta ve organik taşıyıcı çözücülerde çözünmeyen maddeler için, eğer ticari bir ıslatıcı ajanın (Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween) zayıf bir çözeltisi içinde ise çözelti olarak uygulanması daha kolay olabilir.

Uygun kontrol çözeltileri hazırlanmalı yani test maddesini çözmek için çözücü veya dağıtıcı kullanıldığı zaman iki ayrı kontrol grubu kullanılmalıdır: Birisi suyla muamele edilen, diğeri çözücü/taşıyıcı ile muamele edilendir.

1.6. İşlem

1.6.1. Test ve kontrol grupları

Test edilen doz sayısı ve tekrarlar LD_{50}'nin %95'lik güven aralığında belirlenmesindeki istatistiksel ölçütleri sağlamalıdır. Normal olarak test için geometrik seri halinde LD_{50} aralığını kapsayan ve aralarında 2.2 faktörünü geçmeyen çarpanlar halinde değişen 5 doz gereklidir. Ancak toksisite eğrisine (doz oranına karşı-ölüm) göre seyreltme oranı ve konsantrasyonların sayısı belirlenmelidir ve sonuçların analizinde seçilen istatistiki yöntem dikkate alınmalıdır. Bir aralık bulma testi uygun dozdaki derişimlerin bulunmasını sağlar.
10 arıdan oluşan en az 3 tekrar her bir konsantrasyon ile doz ayarlanmalıdır. 10 arıdan oluşan en az 3 kontrol grubu test grubuna paralel olarak yürütülmelidir. Eğer organik bir çözücü ya da ıslatıcı kullanıldıysa her bir 10 arı için çözücü ve ıslatıcılarla kontrol grupları dâhil edilmelidir.

1.6.1.1. Toksik standart

Test serileri bir toksik standardı içermelidir. Beklenen LD_{50} değerini kapsayacak en az 3 doz seçilmelidir. Her test dozunda her biri 10 arı içeren en az 3 tekrar kovanı kullanılmalıdır. Tercih edilen toksik standart rapor edilen 24 saatlik ağız yolu ile LD_{50} değeri 0.10–0.30 µg/arı olandimetoattır. Ancak beklenilen doz yanıtını doğrulayacak verinin bulunduğu diğer toksik standardlarda kullanılabilir (örneğin, parathion).

1.6.2. Maruz kalma

1.6.2.1. Dozların uygulanması

Anestezi edilmiş arılar birer birer bölgesel olarak uygulama ile muamele edilir. Arılar farklı test dozları ve konsantrasyonlara rasgele dağıtılır. Test maddesinin uygun bir çözeltisi içeren bir çözeltinin 1 µl hacmi mikro uygulayıcı ile her arının göğüs boşluğunun sırt kısmına uygulanır. Eğer doğrulandıysa başka hacimlerde kullanılabilir. Uygulamadan sonra arılar test kovanlarına alınır ve sükroz çözeltisi verilir.

1.6.2.2. Süre

Testin süresi tercihen 48 saattir. Eğer ölüm artış oranı 24 saat ile 48 saat arasında %10 'dan fazla ise, ilk test süresi, kontrolün ölüm oranı, %10' u geçmeyecek şekilde maksimum 96 saate çıkarılmalıdır.

1.6.3. Gözlemler

Ölüm testin başlangıcından 4 saat sonra ve daha sonra 24 saat ve 48 saatte kaydedilir (dozu verdikten sonra). Eğer daha uzun bir gözlem süresi gerekiyorsa kontrolün ölüm oranı %10' u geçmeyecek şekilde maksimum 96 saate kadar 24 saatlik aralıklarla daha ileriki tespitler yapılmalıdır.

Test süresi içinde gözlenen bütün beklenmeyen davranış etkileri kaydedilmelidir.

1.6.4. Sınır testi

Bazı durumlarda (test maddesinin düşük toksisiteye sahip olduğu beklenen maddelerde), LD_{50} 'nin bu değerden daha büyük olduğunu göstermek için, 100 µg/ arı kullanarak bir limit testi uygulanmalıdır. Test dozu için 3 tekrar test grubu; bağıl kontroller, tüketilen besin miktarının değerlendirilmesini, toksik standartı, içeren aynı prosedür kullanılmalıdır. Eğer ölüm gerçekleşirse tam bir çalışma yürütülmelidir. Eğer alt ölümcül etkiler gözlenirse (bakınız 1.6.4) bunlar kaydedilmelidir.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Veriler

Veriler, her bir muamele grubu, kontrol ve toksik standart gruplar, kullanılan arı sayısı, her gözlem zamanında izlenilen ölüm, ters davranış gösteren arı sayısını gösterecek şekilde bir tablo halinde özetlenmelidir. Ölüm verileri uygun istatistiksel yöntemlerle analiz edilir. (istatistiksel ihmal birimi analizi, binom olasılığı, ortalama)(3)(4). Doz-cevap eğrisi önerilen her bir gözlem zamanında (24 s, 48 s ve gerekliyse 72 s ve 96 s) çizilir ve %95 güven aralığında ortalama ölüm dozları (LD_{50}) ve eğrinin eğimi hesaplanır. Abbott düzeltmesi kullanılarak ölüm kontrolü üzerinde düzeltmeler yapılabilir.(4)(5).. LD_{50} arı başına düşen µg cinsinden test maddesi olarak ifade edilir.

2.2. Test raporu

Test raporu aşağıdakileri içermelidir.

2.2.1. Test maddesi

- Fiziksel doğası ve ilgili fizikokimyasal özellikler(örneğin, sudaki kararlılık, buhar basıncı)
- Yapısal formül, saflık gibi özellikleri içeren kimyasal tanımlama verileri(pestisitler için aktif maddelerin tanımı ve derişimi)

2.2.2. Test türleri

- Bilimsel isim, ırk, yaklaşık yaş(hafta), toplama yöntemi, toplama tarihi
- Test arılarının toplanması için kullanılan koloniler hakkında sağlık, herhangi bir yetişkin hastalığı, herhangi bir ön işlem hakkında bilgi.

2.2.3. Test şartları

- Deney odasının sıcaklık ve bağıl nemi
- Tür, büyüklük ve kovan maddesi gibi barınma koşulları
- Test ve stok çözeltilerinin hazırlanma yöntemi(kullanıldığında, çözücü ve konsantrasyonu)
- Test tasarımı, kullanılan konsantrasyonlar ve sayısı, kontrol sayısı, her bir test konsantrasyonu ve kontrol için tekrar kovanlarının sayısı ve her kovandaki arı sayısı
- Test tarihi.

2.2.4. Sonuçlar

- Eğer yapıldıysa ön aralık bulma testinin sonuçları
- Ham veriler: her gözlem zamanında ve dozda ölüm oranı
- Testin sonunda doz-cevap eğrilerinin grafiği
- Her bir test maddesi ve toksik standart için önerilen gözlem zamanında %95 güven aralığında LD50 değerleri
- LD50 'nin bulunmasında kullanılan istatistiksel işlem
- Kontroldeki ölüm oranı
- Arıların beklenemeyen davranışı, muamele edilen ve edilmeyen gruplardaki besin tüketim hızı gibi besindeki gözlenen ya da ölçülen diğer biyolojik etkiler
- Burada anılan test işlemlerinden herhangi bir sapma ve diğer ilgili bilgiler.

3. KAYNAKLAR

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision -Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151–165. March 1993.

(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, 119–125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 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, 265–267.

C.18 KESİKLİ DENGE MODELİ KULLANARAK ADSORPSİYON/DESORPSİYON

1. YÖNTEM

Bu test, kesikli denge yöntemi (2000) kullanarak toprak adsorpsiyonu (yüzeye tutunma) / desorpsiyonu (yüzeyden geri sökülme) belirlemesi için OECD TG 106 yönteminin benzeridir.

1.1. Giriş

Bu test ulusal seviyede var olan yönergeleri (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11) ve bir adsorpsiyon testinin(1)(2)(3)(4) geliştirilmesi için toprak seçimi çalıştayının ve halka testinin sonuçlarını göz önüne alır. Adsorpsiyon/desorpsiyon çalışmaları kimyasalların hareketliliği ve onların topraktaki sudaki, havadaki ve biyokürenin başka bölümlerindeki dağılımı üzerine gerekli bilgiler oluşturmak için yararlıdır (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Bilgiler, bozunma için kimyasalın varlığını (22)(23), organizmalar tarafından dönüşüm ve alınması (24), toprak tarafından süzülümünü (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), topraktan buharlaşabilirliğini (21)(29)(30), yüzey sularından kaynak sularına akışını (18)(31)(32) tahmin etmek ya da hesaplamak için kullanılabilir. Adsorpsiyon verileri karşılaştırma ve modelleme amacıyla da kullanılabilir. (19)(33)(34)(35).

Kimyasalın toprak ve sulu fazlar arasında dağılımı; maddenin kimyasal doğası (12) (36) (37) (38) (39) (40), toprağın tanımlayıcı özellikleri (4)(12)(13)(14)(41)(42) (43)(44)(45)(46)(47)(48)(49), yağış miktarı, sıcaklık, güneş ışığı rüzgâr gibi iklimsel şartlar gibi pek çok farklı değişkenden etkilenen çok karmaşık bir süreçtir. Bu yüzden kimyasalın toprakta adsorpsiyonu pek çok kavram ve mekanizmadan etkilendiği için mevcut yöntemdeki gibi küçük çapta basitleştirilmiş bir laboratuvar modeli ile bütünüyle açıklanamaz. Ancak her ne kadar bu test bütün çevresel etken değişkenlerini bütünüyle içermese bile, kimyasalın adsorpsiyonu hakkında değerli bilgiler sağlar.
Ayrıca bakınız Genel Giriş.

1.2. Kapsam

Bu yöntem bir maddenin topraktaki adsorpsiyon/desorpsiyon davranışını hesaplamayı amaçlar. Amaç pek çok değişik deneysel şartta dağılımı tahmin etmek için bir tutunma değeri elde etmektir, bu amaçla kimyasal için değişik topraklarda denge adsorpsiyon katsayıları, toprağın özelliklerinin (organik karbon içeriği, kil içeriği, toprak ve pH) doğal olarak bulunan topraklarla maddenin etkileşimini mümkün olduğu kadar geniş ölçüde kapsayabilmek için çok değişik topraklar kullanılır. Bu yöntemde adsorpsiyon, kimyasalının toprak yüzeylerine olan bağlanmasını tanımlar ve farklı adsorpsiyonları (fiziksel adsorpsiyon, kimyasal adsorpsiyon), yüzeyde katalitik bozunma, yığın adsorpsiyonu ya da kimyasal tepkime gibi süreçleri belirtmez. Toprak tarafından meydana getirilen asılı (kolloidal) parçacıklar üzerine(çap<0.2 mm) gerçekleşecek olan adsorpsiyon dikkate alınmaz.

Adsorpsiyonda en önemli olduğu düşünülen toprak değişkenleri şunlardır:
Organik karbon içeriği (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48); kil içeriği ve toprak dokusu (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46) (47)(48) ve iyonlaşabilen bileşikler için pH (3)(4)(42).

Maddenin adsorpsiyon/desorpsiyonunda önemli olabilecek olan diğer toprak değişkenleri etkin katyon değiştirme kapasitesi, amorf demir ve aluminyum oksit içerikleri (özellikle volkanik ve tropik topraklar için(4)) ve özgül yüzey alanıdır, (49).

Bu test farklı bir maddenin organik karbon içeriğine, kil içeriğine, toprak dokusuna ve pH değerine sahip farklı topraklara adsorpsiyonunu hesaplamak için tasarlanmıştır.

Bu test 3 aşamadan oluşur:

1.Aşama:
- toprak/çözelti oranı
- test maddesinin dengede adsorplanan miktarı ve adsorpsiyon için denge süresi
- adsorpsiyon maddesinin test kaplarının yüzeylerine olan adsorpsiyonu ve test maddesinin test süresindeki kararlılığını;

belirlemek için yapılan öncül çalışmadan oluşur.

2.Aşama:
İzleme testi: Adsorpsiyon, beş farklı toprakta tek bir konsantrasyonda adsorpsiyon kinetiği ve Kd ve K_{oc} dağılım katsayılarının belirlenmesi ile çalışılır.

3.Aşama
Freundlich adsorptin izotermlerinin belirlenmesi: Derişimin toprak üzerine adsorpsiyon miktarına olan etkisini belirlemek için Freundlich adsorpsiyon izotermlerinin belirlenmesi ve desorpsiyonunda/desorpsiyon kinetiği ve Freundlich desorpsiyon izotermi ile belirlenmesinden oluşur. (EK I)

1.3. Tanımlar ve birimler

Sembol	Tanım	birim
At_i	t_i anındaki adsorpsiyon yüzdesi	%
A_{eq}	Adsorpsiyon dengesindeki adsorpsiyon yüzdesi	%
$m_s^{ads}(t_i)$	t_i anında toprağa adsorplanan maddenin kütlesi	µg
$ms^{ads}_{(\Delta ti)}$	Δt_i zaman aralığında toprağa adsorplanan test maddesi miktarı	µg
$m_s^{ads}{}_{(eq)}$	Adsorpsiyon dengesinde toprağa adsorplanan test maddesi miktarı	µg
m_0	Adsorpsiyon testinde tüpte bulunan başlangıçtaki madde kütlesi	µg
$m_m\ ads(t_i)$	(v_a^A)kadar alikuotta t_i anında ölçülen madde miktarı	µg
$m_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$	Adsorpsiyon dengesinde çözeltide bulunan madde miktarı	µg
m_{soil}	Kuru toprak miktarı olarak ifade edilen toprak kütlesi	g
C_{st}	Maddenin stok çözeltisinin kütle derişimi	µg cm^{-3}
C_0	Toprakla temasta olan çözeltinin başlangıçtaki kütle derişimi	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	Sulu fazda t_i anında maddenin kütle derişimi	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}{}_{(eq)}$	Adsorpsiyon dengesinde toparağa adsorplanan maddenin	µg g^{-1}

	miktarı	
$C_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$	Adsorpsiyon dengesinde maddenin sulu fazdaki kütlece derişimi	$\mu g\ cm^{-3}$
V_0	Test boyunca toprakla etkileşen sulu fazın başlangıç hacmi	cm^3
v_a^A	Test maddesinin ölçüldüğü hacim	cm^3
K_d	Adsorpsiyon için dağılım katsayısı	$cm^3\ g^{-1}$
K_{oc}	Organik karbona göre normalize edilmiş adsorpsiyon katsayısı	$cm^3\ g^{-1}$
K_{om}	Organik maddeye göre normalize edilmiş adsorpsiyon katsayısı	$cm^3\ g^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlich adsorpsiyon katsayısı	$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$
1/n	Freundlich üsteli	
D_{ti}	T_i anındaki desorpsiyon yüzdesi	%
Δ_{ti}	Δ_{ti} zamanına karşılık gelen desorpsiyon yüzdesi	%
K_{des}	Görünen adsorpsiyon katsayısı	$cm^3\ g^{-1}$
K_F^{des}	Freundlich adsorpsiyon katsayısı	$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t\ i)$	t_i anında topraktan desorbe olan maddenin kütlesi	µg
$m_{aq}^{des}(\Delta ti)$	Δt_i aralığında topraktan desorbe olan maddenin kütlesi	µg
$m_m^{des}{}_{(eq)}$	Desorpsiyon dengesinde desorbe olan maddenin toplam kütlesi	µg
$m_{aq}^{des}{}_{(eq)}$	Desorpsiyon dengesinde sulu fazdaki maddenin toplam kütlesi	mg
$m_s^{des}(\Delta ti)$	Δt_i zaman sonra toprağın üzerinda adsorbe olan madde kütlesi	mg
m_{aq}^A	Yetersiz hacim değişimi nedeniyle adsorpsiyon dengesinde kalan madde kütlesi	µg
$C_s^{des}{}_{(eq)}$	Desorpsiyon dengesinde toprak üzerinde tutunan maddenin toplam kütlesi	$\mu g\ g^{-1}$
$C_{aq}^{des}{}_{(eq)}$	Desorpsiyon dengesinde sulu fazdaki maddenin toplam kütlesi	$\mu g\ cm^{-3}$
V_T	Seri yöntemle yürütülen adsorpsiyon kinetiği deneyi sırasında toprakla temas halinde olan toplam sulu faz hacmi	cm^3
V_R	Adsorpsiyon dengesine ulaştıktan sonra test tüpünden ayrılan ve 0.01 M $CaCl_2$ ile yerdeğiştiren süpernatantın hacmi	cm^3
v_a^D	Seri yöntemle yürütülen desorpsiyon kinetiği deneyi sırasında analitik amaçla (i) zamanında alınan alikuot örnek hacmi	cm^3
V_r^i	Tüp (i) 'den desorpsiyon kinetiği deneyinde ölçüm için alınan test çözeltisinin hacmi	cm^3
V_r^F	Tüpten desorpsiyon kinetiği deneyinde test maddesinin ölçümü için alınan test çözeltisinin hacmi	cm^3
MB	Kütle denkliği	%
m_E	İki aşamada test kaplarının duvarlarından ve topraktan ekstrakte edilen toplam madde kütlesi	µg

V_{rec}	Adsorpsiyon dengesinden sonra geri kazanılan süpernatantın hacmi	cm^3
P_{ow}	Oktanol/su dağılım katsayısı	
pK_a	Ayrışma sabiti	
S_w	Sudaki çözünürlük	$g\ l^{-1}$

1.4. Test yönteminin ilkesi

Radyoaktif işaretli ya da işaretli olmayan ve 0.01 M $CaCl_2$ içinde bilinen derişimlerdeki test maddesi çözeltisinin bilinen hacimleri, 0.01 M $CaCl_2$ ile ön-dengelenmiş olduğu bilinen kuru ağırlıktaki toprak örneklerine eklenir. Karışım uygun bir süre karıştırılır. Toprak süspansiyonları sonra santrifüj ile ve eğer istenirse süzmeyle ayrılır ve sulu faz analiz edilir. Toprak tarafından adsorplanan test maddesi miktarı test maddesinin başlangıçtaki ve deneyin sonundaki miktarları arasındaki farktan hesaplanır.

Bir alternatif olarak test maddesinin adsorplanan miktarı doğrudan toprağın analizi ile de gerçekleştirilebilir (Doğrudan ölçüm yöntemi). Uygun bir çözücüde aşamalı toprak ekstraksiyonunu içeren bu işlem, maddenin çözeltideki konsantrasyonun doğru olarak belirlenemediği hallerde tavsiye edilir. Bu tür hallere örnekler test kaplarına madde adsorpsiyonu, test maddesinin test süresindeki kararsızlığı, çözeltide düşük konsantrasyon farkını yaratan zayıf adsorpsiyondur. Eğer radyoaktif işaretli bir madde kullanılırsa, toprak fazın yakılması ve sıvı sintilasyon sayımının yapılması ile toprak ekstraksiyondan kaçınılabilir. Ancak sıvı sintilasyon sayımı ana ve dönüşüm ürünlerini biribirinden ayırmayan ve özgün olmayan bir yöntemdir ve bu yüzden ancak maddenin test süresince kararlı olduğu hallerde kullanılmalıdır.

1.5. Test maddesi hakkında bilgi

Kimyasal reaktifler analitik saflıkta olmalıdır. İşaretli olmayan maddelerin bilinen derişimde ve en az %95 saflıkta olması ve eğer radyoaktif işaretli ise bilinen bileşimde ve radyoaktif saflıkta olması önerilir. Düşük yarı-ömüre sahip radyoaktif izleyiciler kullanıldığında bozunma düzeltmeleri uygulanmalıdır. Adsorpsiyon/desorpsiyon uygulanmadan önce test maddesine ilişkin aşağıdaki bilgiler bilinmelidir.

a) Sudaki çözünürlük (A.6);
b) Buhar Basıncı (A.4) ve/veya Henry yasası sabiti;
c) Abiyotik Bozunma: pH 'ın fonksiyonu olarak hidroliz (C.7);
ç) Dağılım katsayısı (A.8);
d) Kolay biyolojik bozunabilirlik (C.4) veya Aerobik ve toprakta aerobik olan ve aerobik olmayan dönüşüm
e) İyonlaşabilir maddelerin pK_a'sı;
f) Suda direk fotoliz (suda UV-Vis Absorpsyion Spektrumu, Kuantum verimi) ve toprakta ışıkla bozunma

1.6. Testin uygulanabilirliği

Bu yöntem yeterli doğrulukta bir analitik yöntemin mevcut olduğu kimyasal maddeler için uygulanabilirdir. Özellikle dolaylı yöntem kullanıldığında sonuçların güvenilirliğini, etkileyen önemli bir parametre test maddesinin test süresi boyunca gösterdiği kararlılıktır. Bu yüzden

kararlılığı bir ön çalışma ile kontrol etmek önşarttır. Eğer testin zaman ölçeğinde bir dönüşüm gerçekleşiyorsa, ana çalışmanın hem sulu fazda hemde toprakla yürütülmesi önerilir.
Büyük ölçüde yüklü ve sudaki çözünürlükleri az olan maddeler ($S_w < 10^{-4}$ g L^{-1}), için bu testin yürütülmesinde, sulu fazdaki konsantrasyon analitik doğrulukla ölçülemediği için, zorluklar ortaya çıkabilir. Bazı durumlarda ilave adımlar gerekebilir. Bu problemlerin nasıl üstesinden gelineceğine ilişkin yönerge bu yöntemin ilgili kısımlarında verilmiştir. Uçucu bileşikler analiz edilirken madde kayıplarından kaçınmak için dikkatli olunmalıdır.

1.7. Test yönteminin tanımlanması

1.7.1. Düzenek ve kimyasal reaktifler

Standard labaratuvar ekipmanı, özellikle aşağıdakiler gereklidir.

a) Deneyleri yürütmek için tüpler ve kaplar. Bu tüp ve kapların
- santrifüj cihazına transfer ve elleçleme hatalarını en aza indirmek için tam uymasına
- test maddesinin yüzeye adsorpsiyonunu en aza indirmek için reaktif olmayan soy malzemeden yapılı olmasına dikkat edilmelidir.

b) Karıştırma cihazı: sabit çalkalayıcı yada eşdeğer ekipman. Bu ekipman toprağı, karıştırırken süspansiyon halinde tutmalıdır.
c) Santrifüj: tercihen yüksek hızlı, örneğin santfifüj hızı>3000 g olan, sıcaklık kontrollü, 0.2 µm'den daha büyük partikülleri çözeltiden uzaklaştırma kabiliyetine sahip olmalıdır. Kaplar, karıştırma ve santrifüj esansında su kaybı ve uçuculuğu engellemek ve adsorpsiyonu engellemek için sıkıca kapatılmalıdır. Teflondan yapılmış kapaklar bu amaca uygundur.
ç) Tercihen: süzme cihazı, Filtreler 0.2 µm gözenekli, arınık (steril) ve tek kullanımlık olmalıdır. Ayrıca filtre malzemesinin seçiminde test maddesinin kaybını engellemek için özenle dikkat gösterilmelidir. Az çözünen test maddeleri için organik filtre malzemesi önerilmez.
d) Test kimyasalının konsantrasyonunu ölçmek için uygun analitik cihazlar,
e) Sıcaklığı 103 °C-110 °C arasında tutabilen laboratuvar fırını

1.7.2. Toprağın seçimi ve karakterizasyonu

Topraklar adsorpsiyon kapasitesinin etkilenmesinden sorumlu olan 3 parametre ile kakarakterize edilmelidir: Organik karbon, kil içeriği ve toprak dokusu ve pH. Daha önce belirtildiği gibi (bkz Kapsam) diğer fizikokimyasal özellikler maddenin adsorpsiyon/desorpsiyon özelliklerine etki edebilir ve böyle durumlarda göz önüne alınmalıdır. Toprağın (karakterizasyonu için kullanılan yöntemler çok önemlidir ve sonuçlar üzerinde önemli derecede etkiye sahiptir. Bu yüzden toprağın pH değerinin karşılık gelen yönteminde (TS 8332 ISO–10390–1) olduğu gibi 0.01 M $CaCl_2$ (adsorpsiyon/desorpsiyon testinde kullanılan çözelti) içinde ölçülmesi önerilir. Ayrıca toprağın diğer ilgili özelliklerinin standard yöntemler kullanılarak (örneğin ISO "toprak analizinin el kitabı") belirlenmesi önerilir. Bu işlem adsorpsiyon verilerinin küresel ölçekte stadartlaştırılmış toprak parametrelerine göre analizine imkân verir. Mevcut olan bazı standard yöntemlere ilişkin bazı yol göstermeler referanslarda verilmiştir. Toprak testi yöntemlerinin kalibrasyonu için, standard toprak kullanımı tavsiye edilir.

Adsorpsiyon/desorpsiyon deneyleri için toprak seçimindeki yönergeler Tablo 1'de verilmiştir. Seçilen yedi toprak örneği, coğrafi bölgelerde görülen toprak numunelerini kapsar.

İyonlaşabilen test maddeleri için, seçilen topraklar, test maddesinin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerinin adsorpsiyonunu hesaplamak için, geniş bir pH aralığını kapsamalıdır. Testin değişik aşamalarında kaç farklı türde toprak kullanılacağına ilişkin yol gösterici bilgi 1.9'da "testin yürütülmesi" kısmı altında verilmiştir. Eğer başka tür topraklar tercih edilecekse ölçütleri tam olarak karşılamasa bile Tablo 1'de verilen değişkenlikte ve aynı parametreler üzerinden karakterize edilmelidir.

Tablo 1: Adsorpsiyon - Desorpsiyon için toprak örneklerinin seçimi klavuzu

Toprak Türü	pH Aralığı (0.01 M CaCl2 içinde)	Organik Karbon içeriği (%)	Kil içeriği (%)	Toprak dokusu
1	4.5 – 5.5	1.0 – 2.0	65 – 80	Kil
2	> 7.5	3.5 – 5.0	20 – 40	Verimli kil
3	5.5 – 7.0	1.5 – 3.0	15 – 25	Alüvyon
4	4.0 – 5.5	3.0 – 4.0	15 – 30	Verimli toprak
5	< 4.0 – 6.0§	< 0.5 – 1.5§‡	< 10 – 15§	Verimli kum
6	> 7.0	< 0.5 - 1.0§‡	40 - 65	Verimli kil /kil
7	< 4.5	> 10	< 10	Kum / verimli kum

* FAO ve US sistemine göre (85)

§ Karşılık gelen değerler tercihen verilen aralıktaki değerleri göstermelidir. Ancak eğer uygun toprak malzemesinin bulunmasında güçlükler varsa, belirtilen en az değerlerin altındaki değerler kabul edilebilir.

‡ %0.3'ten daha az organik karbon içeriğine sahip topraklar organik karbon ve adsorpsiyon arasındaki karşılıklı ilişkiyi bozabilir. Bu yüzden %0.3'ten az organik karbon içeriğine sahip toprakların kullanımı önerilir.

1.7.3. Toprakların toplanması ve saklanması

1.7.3.1. Toplama

Toplama için önerilen özel bir örnekleme tekniği yoktur ve çalışmanın amacına göre değişkenlik gösterir (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Aşağıdakiler dikkate alınmalıdır:

a) Saha yanının tarihi hakkında detaylı bilgi gereklidir, bu bölgesellik, bitki örtüsü, pestisit ve gübrelerle muamele, biyolojik katkılar ve kazara oluşan kirlilikleri de içerir.
ISO toprak örnekleme standardları önerileri, örnekleme yerinin açıklamasına göre izlenmelidir.
b) Örnekleme yeri UTM (Evrensel Çapraz Merkatör Projeksiyonu- Avrupa Yatay Verisi) ya da coğrafi koordinatlarına göre açıklanmalıdır. Bu gelecekte belirli toprakların yeniden toplanması veya farklı ülkelerde kullanılan çeşitli sınıflandırma sistemlerine göre açıklanmasını sağlar. Ayrıca yalnızca en fazla 20 cm derinliğindeki bir yatay çerçeveden toplanabilir. Özellikle n–7 toprak türü için O_h yatay düzlemi toprağın bir parçası olarak mevcutsa, bu örneklemeye dahil edilmelidir.

Toprak örnekleri başlangıçtaki toprak özelliklerinin önemli derecede değişmeyeceğini garanti eden bir sıcaklıkta ve kaplar içinde taşınmalıdır.

1.7.3.2. Saklama

Topraktan taze olarak alınan toprak örneklerinin kullanımı tercih edilir. Ancak bunun mümkün olmadığı durumlarda toprak oda koşullarında ve havayla kurutulmuş olarak saklanabilir. Saklama zamanı konusunda bir sınır önerilmemiştir ancak 3 yıldan fazla saklanan toprakların organik karbon içeriği, pH ve CEC değerlerine göre yeniden analiz edilmeleri gerekir.

1.7.3.3. Toprak örneklerinin elleçlenmesi ve test için hazırlanması

Topraklar tercihen 20–25 °C sıcaklıkta havayla kurutulur. Topak çözme (disagregasyon) toprak dokusunu mümkün olan en az şekilde etkileyecek ölçüde en az kuvvetle gerçekleştirilmelidir. Topraklar yaklaşık 2 mm parçacık büyüklüğüne elenir ve bunu yaparken ISO toprak örnekleme standardı (TS ISO 10381–6) takip edilmelidir.

Dikkatlice homojenleştirme, sonuçların tekrarlanabilirliğini artırmak için önerilir. Her bir toprağın nem içeriği üç farklı örneği sabit tartıma gelene dek 105 °C sıcaklığa ısıtılır (12 saat). Bütün hesaplamalar için toprak kütlesi kuru kütleye karşılık gelir.

1.7.4. Test maddesinin toprağa uygulama için hazırlanması

Test maddesi 0.01 M $CaCl_2$ içinde ve damıtık ya da deiyonize(iyonlarından arındırılmış) su içinde çözülür. Kullanılan $CaCl_2$, katyon konsantrasyonunu en aza indirmek ve santrifujlemeyi iyileştirmek için sulu faz olarak kullanılır. Stok çözeltinin konsantrasyonu analitik yöntemin tayin sınırının tercihen 3 kat üzerinde olmalıdır. Üç kat olması bu yöntemde takip edilen metodolojiye göre kesin sonuçlar alınmasını garanti eder. Ek olarak stok çözeltinin derişimi test maddesinin sudaki çözünürlüğünün altında olmalıdır. Stok çözelti tercihen toprak örneklerinin uygulanmasından hemen önce hazırlanmalı ve 4 °C'de ve karanlıkta saklanmalıdır. Saklama zamanı test maddesinin kararlılığı ve çözeltideki konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük çözünürlüğe sahip maddeler ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) için test maddesini çözmek için uygun bir çözünürleştirici ajan kullanılabilir. Bu çözünürleştirici ajan:

(a) su ile metanol veya asetonitril gibi karışabilir olmalıdır.

(b) test maddesinin konsantrasyonu stok çözeltinin toplam hacminin %1'ini geçmemelidir ve toprakla temas haline gelecek olandan daha azı oluşturmalıdır (Tercihen %0.1'den az).
(c) yüzey aktif madde olmamalıdır ve test kimyasalı ile solvolitik (çözücü yardımıyla ayrışma) tepkimesi vermemelidir. Çözünürleştirici ajanın kullanımının şartları belirtilmeli ve test raporunda doğrulanmalıdır.

Az çözünen maddeleri analiz etmenin bir başka yoluda test maddesini sisteme spike ederek vermektir (spiking: derişimi bilinen bir test maddesi örneğini aynı şartlarda asıl örnekle karıştırıp ölçülmeyen değeri ölçülebilir hale getirmek için kullanılan teknik). Alikuot, toprağa ve suya ya da deiyonize suda hazırlanmış 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi içerisine eklenir. Sulu fazdaki organik çözücünün miktarı mümkün olduğu kadar az tutulmalı ve normal olarak 0.01%yi geçmemelidir. Organik çözücü ile spike etme hacim tekrarlanabilirliği sorunu yaratabilir. Bu yüzden eş-çözücü derişimi bütün testlerde aynı olmadığı için test maddesine ilave bir hata getirebilir.

1.8. Adsorpsiyon/desorpsiyon testin yürütülmesindeki ön gereklilikler

1.8.1. Analitik yöntem

Tutunma ölçümlerinin doğruluğunu etkileyen anahtar parametreler: çözelti ve adsorbe edilen fazların analizindeki analitik yöntemin kesinliği, test maddesinin kararlılığı ve saflığı, tutunma dengesine ulaşma, çözelti konsantrasyonundaki değişiminin büyüklüğü, toprak/çözelti oranı ve dengelenme sürecindeki toprak yapısındaki değişim (35)(59–62). Doğruluk hakkındaki bazı örnekler EK–II 'de verilmiştir.

Analitik yöntemin güvenilirliği testte oluşabilecek konsantrasyon aralığında kontrol edilmelidir. Deneyci, uygun doğruluk, duyarlılık, tayin sınırı ve geri kazanılabilirlikte uygun bir yöntem geliştimekte serbesttir.

Bu testin nasıl gerçekleştirileceği ile ilgili yol gösterici bilgi aşağıdaki deneyde verilmiştir.

0.01 M $CaCl_2$'nin uygun bir hacmi, örneğin 100 cm^3, yüksek organik karbon içeriğine ve yüksek adsorplama kapasitesine sahip, belirli bir miktar toprak, örneğin 20 g ile 4 saat karıştırılır. Bu ağırlık ve hacimler analitik gereksinmelere göre değişebilir ancak 1:5 toprak/çözelti oranı başlamak için uygun bir orandır.

Karışımın santrifüj edildiği sulu faz süzülebilir. Stok çözeltinin belirli bir hacmi toprağa nominal testte oluşabilecek derişime ulaşmak için eklenir. Bu hacim ön-dengeleme çözücüsünün doğasını en az oranda değiştirmeli ve son hacmin %10'unu geçmemelidir. Çözelti daha sonra analiz edilir.

Toprak ve $CaCl_2$ çözeltisini içeren bir kör çözelti, analitik yöntemdeki sapmaları ve topraktaki matriks etkilerini kontrol etmek ve bertaraf etmek için analize dâhil edilmelidir.

Tutunma ölçümleri için kullanılabilecek olan yöntemler, gaz-sıvı kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, spektrometri (örneğin Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi, HPLC-kütle spektrometrisi, radyoaktif işaretli maddeler için sıvı sintilasyon sayıcısıdır). Kullanılan analitik yöntemden bağımsız olarak, eğer geri kazanım değerleri nominal değerin %90 ve %110 'si arasında değişiyorsa uygun kabul edilir. Dağılım gerçekleştikten sonra ölçüm ve hesaplama yapabilmeye olanak sağlayabilmek için, analitik yöntemin tayin sınırı nominal konsantrasyonun en az 2 katı olmalıdır. Adsorpsiyon çalışmalarını yürütmek için mevcut olan analitik yöntemin özellikleri ve tayin sınırları testin bütün deneysel performansında ve test koşullarının açıklanmasında önemli rol oynar.

Bu yöntem genel bir deneysel yol izler ve analitik yöntem ve laboratuvar imkânlarının sınırlamaları koyduğu durumda alternatif çözümler için öneriler ve yol göstermeler sağlar.

1.8.2. En uygun toprak/çözelti oranının seçimi

Uygun toprak çözücü oranlarının seçimi dağılım katsayısı K_d ve istenen adsorpsiyon değerinin bağıl değerine bağlıdır. Çözeltideki maddenin konsantrasyonunun değişmesi, çözeltideki maddenin konsantrasyonunu ölçmeye yarayan ve adsorpsiyon eşitliğine ve analitik metodolojinin sınırına dayanan ölçümüm istatistiksel doğruluğunu belirler.

Bu yüzden genel olarak yüzde adsorplanan >20% tercihen >50%(62) olduğu birkaç karışık oranı kullanmak faydalıdır ancak sulu fazda doğru olarak ölçülmesi için test maddesi konsantrasyonunun yeterince yüksek olması gerekir. Bu özellikle yüksek adsorpsiyon oranlarında önemlidir. Uygun toprak su oranlarını seçerken uygun bir yaklaşım K_d değerinin ya ön çalışmalardan ya da kurulan hesaplama tekniklerinden (EK-III) hesabına dayanır.

Uygun oranın seçimi toprak/çözelti oranının sabit adsorpsiyon yüzdelerinde K_d'ye karşı çizimine dayanır (şekil 1). Bu çizimde adsorpsiyon eşitliğinin doğrusal[1] olduğu kabul edilir.

Uygulanabilir ilişki eşitlik (4) teki K_d değerini eşitlik (1) şeklinde yeniden düzenlemekle elde edilir.

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

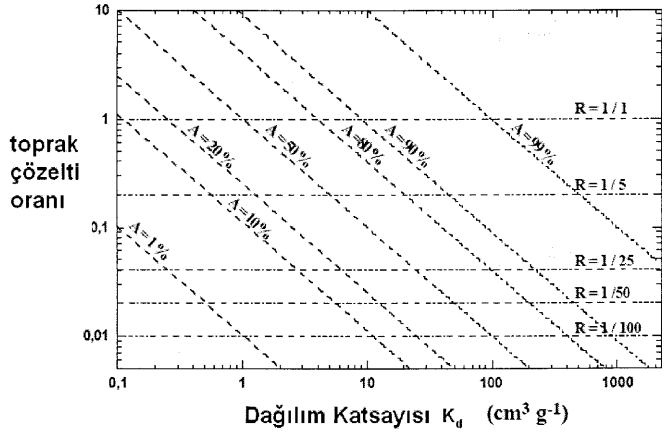
$$R = m_{soil}/V_0 \text{ and } A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}:$$

veya bunun logaritmik formunda kabul ederek;

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$

şeklinde hesaplanabilir.

(1) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.



Şekil 1. Toprak/çözelti oranının farklı yüzdelerde adsorplanan test maddesinin K_d değeri ile değişimi

Şekil 1'de farklı seviyedeki adsorpsiyonlar için Kd'nin fonksiyonu olarak toprak/çözelti oranları verilmiştir. Örneğin toprak çözelti oranı 1:5 ve Kd 20 olduğunda %80 oranında adsorpsiyon oluşur. Aynı K_d değerinde %50 adsorpsiyon elde etmek için 1:25 oranı kullanılmalıdır. Bu yaklaşımla uygun toprak/çözelti oranlarını seçmek araştırıcıya deneysel gerekleri karşılamak için esneklik sağlar.

Ele almanın daha zor olduğu alanlar kimyasalın adsorpsiyonun çok fazla ya da çok az olduğu durumlardır.

Düşük adsorpsiyon olduğunda 1:1 toprak/çözelti oranı kullanılmalıdır. Ancak çok küçük organik toprak türleri için daha küçük oranlar gerekebilir. Çözelti konsantrasyonlarındaki küçük değişimleri ölçerken analitik metodolojiye dikkat edilmelidir. Aksi takdirde adsorpsiyon ölçüleri doğru olmaz. Öte yandan, yüksek dağılım katsayılarında, çözeltide önemli miktarda test maddesi bırakmak için 1:100 toprak/çözelti oranına çıkılabilir. Ancak iyi karıştırılmalı ve sistemin adsorpsiyon dengesine gelmesi için yeterli süre beklenmelidir. Bu tür analitik yöntemin mevcut olmadığı sınır durumlarda K_d değerini tahmin etmek için alternatif bir yöntem P_{ow} değerlerine dayanan hesaplama teknikleri kullanmaktır. Bu yol özellikle P_{ow} değerleri <20 olan düşük adsorplanan/polar kimyasallar ve lipofilik (yağı seven) ve yüksek tutunma özelliğine sahip P_{ow} değerleri $>10^4$ olan kimyasallar için kullanışlıdır.

1.9. Testin performansı

1.9.1. Test koşulları

Bütün deneyler oda sıcaklığında ve eğer mümkünse 20 °C ve 25 °C sabit sıcaklıkta yapılmalıdır. Santrifüjleme koşulları 0.2 µm'den daha küçük parçaçıkların çözeltiden uzaklaştırılmasına olanak sağlamalıdır. Bu değer katı parçacık olarak düşünülen parçalar için bir başlangıçtır ve katı ve kolloid parçacıklar arasındaki sınırı belirler. Santrifüj koşullarının nasıl belirleneceğine ilişkin yol gösterici bilgiler EK IV'te verilmiştir. Eğer santrifüj araçları 0.2 µm'den daha büyük partiküllerin uzaklaştırılmasını sağlayamıyorsa, 0.2 mikronluk filtreler kullanılabilir. Bu filtreler test maddesi kaybına neden olmamak için kimyasal olarak aktif olmayan maddeden yapılmalıdır. Her durumda süzme esnasında test maddesi kaybı oluşmamalıdır.

1.9.2. Aşama 1- Ön çalışma

Ön çalışmanın amacı kapsam kısmında verilmiştir. Böyle bir deneyde, deneyin önerilen kurulumu hakkında yol gösterici açıklamalar aşağıda verilmiştir.

1.9.2.1. En uygun toprak/ çözelti oranın seçimi

Deneylerde iki toprak türü ve üç farklı toprak/çözelti oranı kullanılır. Bir toprak türü yüksek organik karbon içeriğine ve düşük kil içeriğine sahiptir. Diğeri ise düşük organik karbon içeriğine yüksek kil içeriğine sahiptir. Aşağıdaki toprak/çözelti oranları tavisye edilir.

- 50 g toprak ve 50 cm^3 test maddesi çözeltisi (1/1 oranında);
- 10 g toprak ve 50 cm^3 test maddesi çözeltisi (1/5 oranında);
- 2 g toprak ve 50 cm^3 test maddesi çözeltisi (1/25 oranında).

Kullanılacak olan en az toprak miktarı, laboratuvar imkânlarına ve kullanılan analitik yöntemlerin performansına bağlıdır. Ancak testten güvenilebilir sonuçlar elde edebilmek için en azından 1 veya tercihen 2 g madde kullanılmalıdır.

Test sistemleri ile aynı test aşamalarında testin kararlılığını kontrol etmek ve kapların yüzeyine gerçekleşecek muhtemel bir adsorpsiyon için sadece 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi içinde test maddesi içeren ve toprak içermeyen bir kontrol örneği kullanılmalıdır.

Toprak başına, aynı miktar toprak ve toplam 50 $cm^3$0.01 M $CaCl_2$ çözeltisiiçeren (test maddesi içermeyen) kör aynı test işlemine tabi tutulur. Bu, toprakların kirliliğini ve girişim yapan maddeleri tayin etmeyi sağlar. Kontrol ve kör içeren bütün deneyler, en azından iki kere tekrar edilmelidir. Çalışmada yürütülecek olan deneyler için hazırlanacak olan toplam örnek sayısı takip edilen metodolojiye göre hesaplanır. Ana çalışma ve ön çalışma için yöntemler genellikle aynıdır ve gerektiğinde istisnalar belirtilir.
Havayla kurutulmuş toprak örnekler deneyden bir gün önce 45 cm^3 lük 0.01 M $CaCl_2$ ile 12 saat boyunca çalkalanarak dengeye getirilir. Daha sonra, test maddesinin stok çözeltisinin belirli bir hacmi son hacmi 50 cm^3 getirmek için eklenir. Eklenen bu stok çözelti hacmi:

(a) ön dengeleme çözeltisinin doğasını mümkün olduğu kadar az değiştirmek için sulu fazın 50 cm^3 hacminin %10'unu geçmemelidir.

(b) tercihen toprakla temas halinde olan test maddesinin başlangıç konsantrasyonu (C_0) analitik yöntemin tayin sınırının en azından 2 katı bir konsantrasyonla sonuçlanmalıdır. Bu sınır değer yüksek adsorpsiyon (%99) oluştuğunda doğru ölçümler yapabilmeyi ve daha sonra adsorpsiyon izotermleri çıkarabilmeyi sağlar. Ayrıca maddenin bu başlangıç konsantrasyonunun çözünürlüğünün yarısını geçmemesi önerilir.
Stok çözelti konsantrasyonunun nasıl hesaplanacağına ilişkin bir örnek aşağıda verilmiştir. 0.01 µg cm^{-3} tayin sınırı ve %90 adsorpsiyonun gerçekleştiği varsayılır. Bu durumda toprakla temas halinde olan test maddesinin derişimi 1 µg cm^{-3} olur (tayin sınırının büyüklüğünün 2 katından fazla).

Eğer stok çözeltinin tavsiye edilen hacminin eklendiği varsayıldığında (5 ila 45 $cm^3$0.01 M $CaCl_2$dengeleme çözeltisi= stok çözeltinin 50 cm^3 sulu fazının %10'u) stok çözelti derişimi 10 µg cm^{-3} olmalıdır. Bu değer analtik yöntemin tayin sınırının 3 katıdır.

Sulu fazın pH değeri adsorpsiyon işleminde çok büyük bir rol oynadığı için toprakla temas ettirilmeden önce ve sonra özellikle iyonlaşabilen maddeler için ölçülmelidir. Karışım adsorpsiyon dengesine ulaşılana kadar çalkalanır. Denge zamanı kimyasal ve toprağa bağlı olarak oldukça değişkendir ve 24 saatlik bir süreç genellikle yeterlidir (77).

Ön çalışmada 48 saatlik karıştırma sürecinde ardışık zamanlarda toplanabilir (Örneğin 4, 8, 24, 48 saat). Ancak analizin süresi laboratuvardaki çalışma zamanları ile uyum gösterecek esneklikte olmalıdır.

Test maddesinin sulu çözeltideki analizi için iki seçenek vardır: *(a) paralel yöntem ve (b) seri yöntem.*

Paralel yöntem deneysel olarak daha karmaşık olmasına rağmen sonuçların matematiksel olarak işlenmesi daha kolaydır (Ek V). Ancak izlenecek metodolojinin seçimi uygun laboratuvar araçlarını ve kaynaklarını göz önüne alacak olan deneyciye bırakılmalıdır.

(a) paralel yöntem: Aynı toprak/çözelti oranına sahip ve istenilen adsorpsiyon kinetiği çalışmasını gerçekleştirebilecek sayıda örnekler hazırlanır. Santrifüjleme ve süzme işleminden sonra ilk tüpteki sulu faz mümkün olduğu kadar geri kazanılır ve 4 saat, 8 saat ve 24 saat sonra ölçülür.

(b) seri yöntem: Her toprak/çözelti oranı için yalnızca 2 örnek hazırlanır. Tanımlı zaman aralıklarında fazların ayrılması için santrifüj edilir. Sulu fazın küçük bir hacmi (alikuot) hemen analiz edilir daha sonra deney orijinal karışımla devam ettirilir. Eğer süzme işlemi santrifüj işleminden sonra uygulanırsa, laboratuvar küçük hacimleri saklayacak imkanlara sahip olmalıdır. Alınan küçük hacimlerin, toprak/çözelti oranını önemli ölçüde değiştirmemek ve test için kullanılacak toplam kütleyi azaltmamak için çözeltinin toplam hacminin %1'ini geçmemesi önerilir.

Yüzde adsorpsiyon A_{ti} her (t_i) zaman noktasında nominal konsantrasyon ve kör değere göre düzeltilmiş örnekleme zamanına göre hesaplanır.

Bütün A_{ti} 'ye karşı zaman verileri, denge platosuna ulaşma anını kestirebilmek için oluşturulur (Ek 5'teki şekil 1). K_d değeri ayrıca hesaplanır. Bu K_d değerine dayanarak yüzde adsorpsiyonun %20'ye tercihen %50 ye vardığı uygun toprak/çözelti oranları Şekil 1'den seçilir (61). Grafiklemeye uygulanabilir bütün denklemler, ilkeler ve verilerin raporlanması Ek V'te verilmelidir.

1.9.2.2. Denge adsorpsiyon zamanının belirlenmesi ve dengede adsorplanan test maddesi miktarının belirlenmesi

Daha önce belirtildiği gibi A_{ti} yada C_{aq}^{ads} karşı zaman grafiği test maddesinin dengede adsoplanan miktarının ve adsorpsiyon dengesine ulaşma anını kestirimine olanak sağlar ve buna ilişkin örnekler Ek V'teki şekil 1 ve şekil 2'de verilmiştir.

Denge zamanı sistemin plato değerine ulaşması için gereken zamandır.

Eğer bir toprakta plato[1] değeri yerine sürekli bir artış gözlenirse, bu biyolojik bozunma veya yavaş düfüzyon gibi zorlaştırıcı faktörlere bağlı olabilir. Biyololjik bozunma, arındırılmış (steril) toprak örnekleri ile deney tekrar edilerek gösterilebilir.

Eğer bu durumda plato değerine ulaşılamıyorsa, deneyci çalışmalarındaki diğer kavramları dikkate almalıdır. Bu deneysel koşullarda (sıcaklık, çalkalama zamanı, toprak/çözelti oranı) uygun değişiklikler yapılarak gerçekleştirilebilir. Eğer dengeye ulaşılamamışsa devam edip etmeme kararı deneyciye kalmıştır.

1.9.2.3. Test kabının yüzeyine adsorpsiyon ve test maddesinin kararlılığı

Test maddesinin ve test maddesinin kararlığına ilişkin bazı bilgiler kontrol örneklerini analiz ederek gerçekleştirlebilir. Eğer analitik yöntemin standard hatasından daha büyük bir azalma gözleniyorsa, abiyotik bozunma ve test kabının yüzeyine adsorpsiyon meydana gelmiş olabilir. Bu iki kavram arasında ayrım kabın duvarlarını uygun bir çözücü ile iyice yıkayarak yıkama çözeltisini test maddesi için analiz ederek anlaşılabilir. Eğer yüzeye adsorpsiyon gözlenmemişse azalma abiyotik bozunmadan ve test maddesinin kararsızlığından kaynaklandığı anlaşılır. Eğer adsorpsiyon bulunursa, test kaplarının yapılış maddesinin değiştirilmesi gereklidir.

Ancak test maddesinin kabın duvarlarına olan adsorpsiyon verileri, toprak/çözelti deneylerine doğrudan ekstrapole edilemez. Toprağın varlığı bu tür adsorpsiyonu etkiler.
Test maddesinin zamana karşı kararlılığı ana maddenin kütle denkliğinden türetilebilir. Bu, sulu faz toprak ekstraktları ve test kaplarının duvarlarının test maddesi için analizi anlamına gelir. Eklenen test kimyasalının kütlesi ve test kimyasallarının sulu fazdaki miktarlarının toplamı, toprak ekstraktları ve test duvalarlarındaki miktarlar arasındaki fark bozunan ve/veya buharlaşan ve/veya ekstrakte edilemeyen kütleye eşittir. Kütle denkliği belirlemesi gerçekleştirebilmek için, adsorpsiyon dengesine deneyin süresi içinde ulaşılmalıdır.

Kütle denkliği hem toprakta hemde %20 azalma ve tercihen dengede >%50 azalma veren tek bir toprak/çözelti oranında gerçekleştirilmelidir. Oran bulma deneyi sulu fazdaki son örneğin 48 saat sonra analizi ile tamamlandığında, fazlar santrifüj ile yada istenirse süzme ile ayrılır. Sulu faz mümkün olduğu kadar fazla oranda geri kazanılır ve uygun bir ekstraksiyon çözücüsü (ekstraksiyon katsayısı en az %95 olan) test maddesini ekstrakte etmek için toprağa eklenir. İki ardışık ekstraksiyon önerilir. Test maddesinin topraktaki ve test kabı ekstraktındaki miktarı belirlenir ve kütle denkliği (Eşitlik 10, Veriler ve Raporlama) hesaplanır.

Eğer bu değer %90 ise, test maddesi testin zaman aralığında kararsız kabul edilir.
Ancak çalışmalar test maddesinin kararsızlığı göz önüne alınarak sürdürülebilir. Bu durumda ana çalışmadaki tüm fazların analizi önerilir.

1.9.2.4. Aşama 2; Test maddesinin tek bir derişimindeki adsorpsiyon kinetiği

Tablodan seçilen 5 toprak kullanılır. Ön çalışmada kullanılan toprakların bir kısmını ya da tamamını kullanmanın avantajı vardır. Bu durumda Aşama 2' nin önl çalışmadaki topraklar için yeniden tekrar edilmesine gerek yoktur.

---

[1] Plato: Test maddesinin sulu fazdaki konsantrasyonunun (C_{aq}^{ads}) zamana karşı grafiği, aynı zamanda denge platosuna erişimi tahmin etmmekta kullanılır (bakınız Ek -V şekil 2).

Dengeye ulaşma zamanı, toprak/çözelti oranı toprak örneğinin ağırlılığı, toprakla temas halindeki sulu fazın hacmi ve test maddesinin konsantrasyonu ön çalışmada elde edilen sonuçlara göre seçilir. Analiz tercihen 2, 4, 6, 8 (ayrıca 10) ve 24 saatlik temas zamanlarında yürütülmelidir. Muamele zamanı oran bulma sonuçlarına göre eğer kimyasal uzun dengelenme zamanı istiyorsa 48 saat'e uzatılabilir. Ancak analiz zamanları esneklikle ele alınabilir.

Her deney sonuçlarının değişkenliğini hesaplamak için en azından (bir toprak ve bir çözelti) 2 paralel örnek kullanılmalıdır.

Her deneyde, bir kör çözeltide yürütülür. Bu kör çözelti; toprak, test maddesi içermeyen 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi sırasıyla deneye özgü ağırlık ve hacmi içerir. 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi içinde sadece test maddesi içeren (toprak içermeyen) bir kontrol örneği beklenmedik sonuçlara karşı koruyucu olarak aynı test işlemine tabi tutulur. Yüzde adsorpsiyon her bir A_{ti} zaman noktasında ve/veya zaman aralıklarında $A_{\Delta ti}$ (gereksinmeye göre) hesaplanır ve zamana karşı grafiğe geçirilir. Dengedeki dağılım katsayısı K_d, organik karbon içeriği normalize edilmiş adsorpsiyon katsayısı K_{oc} da (Polar olmayan organik kimyasallar için) hesaplanır.

Adsorpsiyon kinetiği testinin sonuçları

Doğrusal K_d değeri genellikle topraktaki tutunma davranışı için genellikle doğrudur (35)(78) ve kimyasalın topraktaki doğal hareketliği için bir açıklama getirir. Örneğin K_d değeri $1 \leq cm^3 g^{-1}$ olan genel kimyasallar nitel olarak hareketli kabul edilir.

Benzer şekilde K_{oc} değerleri için bir hareketlikik sınıflandırması MacCall ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (16). DT-50[1] (32)(79) ve K_{oc} değerlerine dayanan bir özütleme sınıflandırması vardır. Ayrıca hata analizi sonuçlarına göre (61), 0.3 $cm^3 g^{-1}$ altındaki K_d değerleri sulu fazdaki konsantrasyon azalmasından, en uygun toprak/çözelti oranı kullanılsa bile doğru olarak hesaplanamaz. Bu durumda her iki fazın toprak ve çözelti, analizi önerilir.

Yukarıdaki yorumlara göre, bir kimyasalın topraktaki adsorbe edici davranışı ve potansiyel hareketliliği çalışmalarına bu yöntemdeki deneysel protokollerle K_d'nin doğru belirlemesinin mümkün olduğunda Freundlich adsorpsiyon izotermleri çıkarılarak devam edilmesi önerilir.

Ölçümler sulu fazdaki konsantrasyon azalması ölçümlerine dayandığında (dolaylı metod) K_d ve toprak/çözelti oranını çarpmakla elde edilen değer >0.3 oluyorsa, her iki fazda analiz edildiğinde (doğrudan metod) (61) değer >0.1 oluyorsa doğru belirleme mümkündür.

1.9.2.5. Aşama 3 - Adsorpsiyon izotermleri ve desorpsiyon kinetiği/desorpyion izotermleri

1.9.2.5.1. Adsorpsiyon izotermleri

İki kat büyüklük sırası içeren 5 farklı test maddesi konsantrasyonu kullanılır. Bu derişimlerin seçiminde sudaki çöznürülük ve dengedeki sulu konsantrasyonlar dikkate alınmalıdır. Çalışma süresince aynı toprak/çözelti oranı korunmalıdır. Adsorpsiyon testi yukarıda açıklandığı şekliyle yürütülmelidir. Tek fark sulu faz Aşama 2'de daha önce belirlenen zamanda dengeye ulaştığında bir kez ölçülür. Çözeltideki denge konsantrasyonları belirlenir

[1]DT-50: test maddesinin %50' sinin bozunma zamanı

ve adsorplanan miktar test maddesinin çözeltideki azalmasından ya da doğrudan yöntemle belirlenir.

Toprağın birim kütlesi başına adsorplanan kütle test maddesinin denge konsantrasyonunun fonksiyonu olarak grafiği çizilir (bakınız Veriler ve Raporlama).

Adsorpsiyon izotermi deneylerinden elde edilen sonuçlar

Buraya kadar önerilen matematiksel adsorpsiyon modellerinden Freundlich izotermi adsorpsiyon işlemini açıklamak için en sıklıkla kullanılanıdır. Sonuçların yorumlanması ile ilgili daha detaylı bilgi ve adsorpsiyon modellerinin önemine ilişkin bilgiler referanslarda verilmiştir (41)(45)(80)(81)(82).

Not:
Freundlich adsorpsiyon katsayısı K_F farklı maddeler için karşılaştırılması bu değerler aynı birimdeyse mümkündür (83).

1.9.2.5.2. Desorpsiyon kinetiği

Bu deneyin amacı, kimyasalın toprağa tersinir mi tersinmez mi şekilde adsorplandığını araştırmaktır. Bu bilgi kimsayalın topraktaki davranışını anlayabilmek için önemlidir. Daha ötesi; desorpsiyon verileri, bilgisayar modellemeleri ve benzetişimleri için faydalıdır. Eğer bir desorpsiyon çalışması isteniyorsa, aşağıda açıklanan çalışmanın adsorpsiyon kinetiği deneyinden önce her bir sistem için K_d değerinin doğru belirlenmesi için yürütülmesi önerilir. Adsorpsiyon kinetiği çalışmaları ile benzer şekilde desorpsiyon kinetiği çalışmalarını yürütmek için 2 seçenek mümkündür: (a) paralel yöntem ve (b) seri yöntem. Ancak izlenecek metodolojinin seçimi uygun laboratuvar araçlarını ve kaynaklarını göz önüne alacak olan deneyciye bırakılmalıdır.

(a) paralel yöntem: Herbir toprak için aynı toprak/çözelti oranına sahip ve istenilen desorpsiyon kinetiği çalışmasını gerçekleştirebilecek zaman aralığına göre örnekler hazırlanır. Tercihen adsorpsiyon kinetiği deneyindeki aynı zaman aralıkaları kullanılabilir. Ancak toplam zaman desorpsiyon dengesine ulaşacak şekilde genişletilebilir.
Her deneyde (bir toprak, bir çözelti) kör çözelti de yürütülür. Bu kör çözelti; toprak, test maddesi içermeyen 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi sırasıyla deneye özgü ağırlık ve hacmi içerir. Kontrol örneği olarak test maddesi içeren 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi (toprak içermeyen) aynı test işlemine tabi tutulur. Toprağın bütün karışımları çözelti ile adsorpsiyon dengesine ulaşması için karıştırılır (aşama 2'de daha önce belirlendiği gibi). Daha sonra fazlar santrifüjle ayrılır ve sulu fazlar mümkün olduğu kadar uzaklaştırılır.

Uzaklaştırılan çözelti hacmine eşit hacimde test maddesi içermeyen 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi ile tamamlanır ve yeni karşımlar yeniden karıştılır.

İlk tüpteki sulu faz mümkün olduğu kadar geri kazanılır ve örneğin 2 saat sonra ölçülür. 2. tüp 4 saat sonra, 3.tüp 6 saat sonra vb. ve ölçümlere desorpsiyon dengesine ulaşana kadar devam edilir.

(b) seri yöntem: Adsorpsiyon kinetiği deneyinden sonra, karışım santrifüj edilir ve sulu faz mümkün olduğu kadar ayrılır. Uzaklaştırılan çözelti hacmine eşit hacimde test maddesi içermeyen 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi ile tamamlanır ve yeni karşımlar desorpsiyon dengesine

ulaşıncaya kadar yeniden karıştılır. Bu süreçte belirli zaman aralıklarında, karışım fazlarının ayrılması için santrifüj edilir. Test maddesi için sulu fazın küçük bir hacmi (alikuot) hemen analiz edilir ve deney orijinal karışımla sürdürülür. Her bir alikuot toplam hacmin %1'inden daha az olmalıdır. Aynı miktarda taze 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi toprak/çözelti oranını sabitlemek için karışıma eklenir ve karıştırma diğer zaman aralığına dek sürdürülür.

Yüzde desorpsiyon her bir D_{ti} zaman noktasında ve/veya $D_{\Delta ti}$ zaman aralığında (gereksinmeye göre) hesaplanır ve zamana karşı grafiğe geçirilir. Dengedeki desorpsiyon katsayısı K_{des}' da ayrıca hesaplanır. Uygulanabilen tüm denklemler Veriler ve Raporlama kısmında Ek-V' de verilmiştir.

Desorpsiyon kinetiği deneyinden elde edilen sonuçlar

Yüzde desorpsiyon D_{ti} ve adsorpsiyon A_{ti}'nin zamana karşı çizilmiş ortak grafikleri adsorpsiyon işleminin tersinirliğini kestirmeyi sağlar. Eğer desorpsiyon dengesine adsorpsiyon dengesinin 2 katında ulaşılmışsa ve toplam desorpsiyon adsorbe olan miktarın %75'inden fazla ise adsorpsiyon tersinir olarak kabul edilir.

1.9.2.5.3. Desorpsiyon izotermleri

Topraklarda belirlenen Freundlich desorpsiyon izotermleri adsorpsiyon izotermleri deneylerinde kullanılır. Desorpsiyon testi desorpsiyon kinetiği kısmındaki gibi yürütülür ve tek fark sulu faz desorpsiyon dengesinde tek bir kere analiz edilir. Desorbe olan test maddesinin miktarı hesaplanır, desorpsiyon dengesinde toprağın üzerine tutunmuş olarak kalan test maddesi içeriği, test maddesinin çözeltideki denge konsantrasyonunun fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir (bakınız veriler ve raporlama ve Ek-V).

2. VERİLER VE RAPORLAMA

Analitik veriler tablo halinde verilir (bakınız Ek-VI). Her bir ölçüm ve hesaplamaların ortalama değerleri verilir. Adsorpsiyon izotermlerinin grafiksel gösterimleri verilir. Hesaplamalar aşağıdaki açıklamalara göre yapılır.
Bu testteki amaç için 1 cm^3 sulu çözeltinin 1 g ağırlıkta olduğu kabul edilir. Toprak/çözelti oranı w/w ya da w/hacim şeklinde aynı şekilde gösterilebilir.

2.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon A_{ti} test koşullarında test başlangıcındaki madde miktarına göre toprak tarafından adsorplanan miktarının yüzdesi olarak belirtilir. Eğer test maddesi kararlıysa ve test kaplarının duvarlarına önemli ölçüde adsorplanmıyorsa, A_{ti}, aşağıdaki eşitliğe göre her t_i noktasında hesaplanır.

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

Burada:
$A_{ti} = t_i$ (%) anındaki adsorpsiyon yüzdesi

$m_s^{ads}(t_i)$ = toprağa t_i zamanında adsorplanan test maddesinin kütlesi (µg);
m_0 =test tüpünde başlangıçtaki test maddesi kütlesi (µg)

Yüzde adsorpsiyon A_{ti}'nin paralel ve seri yöntemde nasıl hesaplanacağı Ek-V'te verilmiştir.

Dağılım katsayısı K_d test koşullarında ve adsorpsiyon dengesine ulaşıldığında test maddesi içeriğinin toprak fazında ve maddenin sulu çözeltideki kütle derişimi arasındaki orandır.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

Burada:

$C_s^{ads}{}_{(eq)}$ = toprağa adsorpsiyon dengesinde adsorplanan maddenin içeriği (µg g^{-1});
$C_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$ = adsorpsiyon dengesinde sulu fazda bulunan maddenin kütle derişimi (µg cm^{-3}). Bu derişim analitik olarak kör çözeltideki değerleri dikkate alarak belirlenir.
$m_s^{ads}{}_{(eq)}$ = test maddesinina adsorpsiyon dengesinde toprağa adsorplanan kütlesi (µg)
$m_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$ = Adsorpsiyon dengesinde çözeltideki test maddesi kütlesi (µg);
m_{soil} = kuru ağırlık olarak betimlenen toprak miktarı (g);
V_0 = toprakla temas halinde olan sulu fazın ilk hacmi (cm^3).

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

A_{eq} ve K_d arasındaki ilişki:

ile verilir.

burada:

A_{eq} =adsorpsiyon dengesindeki adsorspiyon yüzdesi, %.

Organik karbona göre normalize edilmiş adsorspsiyon katsayısı dağılım katsayısı K_{oc} ile toprağın organik karbon içeriği dağılım katsayısı K_d ile ilişkisi:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (6)$$

Burada:
%OC = toprak örneğindeki organik karbon yüzdesi (g g^{-1})

K_{oc} katsayısı özellikle polar olmayan organik kimyasalların toprak veya çözelti ve su arasındaki dağılmaya ait tek bir değere karşılık gelir. Bu kimyasalların adsorpsiyonu adsorbe eden katını organik karbon içeriği ile ilişkilendilir (7); bu yüzden K_{oc} değerleri orijinindeki ve doğal yapısındaki farklardan kaynaklanan humik kısımların özgün özelliklerine bağlıdır.

2.1.1. Adsorpsiyon izotermleri

Freundlich adsorbsiyon izotermleri ve eşitliği test maddesinin adsorbe edilen miktarı ile dengede çözeltide bulunan test maddesi konsantrasyonunu biribiriyle ilişkilendirir (eşitlik 8).

Veriler adsorpsiyon altında değerlendirilir ve her test tüpü için, test maddesinin toprağa tutunan miktarı hesaplanır ($C_s^{ads}{}_{(eq)}$, ya da x/m).

Dengeye ulaşıldığı ve $C_s^{ads}{}_{(eq)}$ değerinin denge değerine karşılık geldiği kabul edilir.

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \qquad (7)$$

Freundlich adsorpsiyon izotermi

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \qquad (8)$$

Eşitliği ile ya da doğrusal olarak

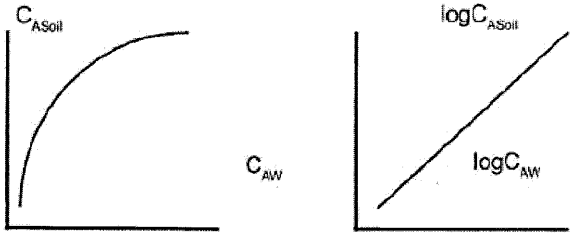
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \qquad (9)$$

şeklinde gösterilir.
Burada:

K_F^{ads}= Freundlich adsorpsiyon katsayısı, 1/n = 1 olduğunda boyutları $cm^3\ g^{-1}$ diğer durumlarda eğim 1/n K_F^{ads} 'in boyutundadır ($\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1}$);
n = regresyon sabiti; 1/n genellikle 0.7 – 1.0, arasında değişir ve bu tutunmanın sıklıkla doğrusal olmadığını gösterir.

Eşitlik (8) ve (9) grafiğe geçirilir ve K_F^{ads} 1/n değerleri regresyon analizinden eşitlik (9) kullanılarak hesaplanır.

Logaritma denkleminin ilgileşim(regresyon) katsayısı r^2 hesaplanır. Bu grafiklerin örnekleri şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Freundlich Adsorpsiyon grafiği, normal ve doğrusal

2.1.2. Kütle denkliği

Kütle denkliği (MB) adsorpsiyon testinden sonra analitik olarak geri kazanılabilen maddenin test maddesinin başlangıçtaki nominal miktarına göre yüzdesi olarak tanımlanır.

Verilerin ele alınması eğer çözücü suyla tamamen karışabiliyorsa farklılık arz eder.

Suyla karışabilen çözücülerde, desorpsiyon altında verilen verilerin ele alınması çözücü ekstraksyonu ile geri kazanılabilen madde miktarının belirlenmesine uygulanabilir.

Eğer bu çözücü suyla daha az karışabilir ise geri kazanılabilen miktarın hesabı yapılabilir.

Adsorpsiyon için kütle denkliği aşağıdaki gibi hesaplanır. Burada m_E terimi organik bir çözücü ile test kimyasalının topraktan ekstrakte edilen kütlesi, test kabının yüzeyindeki miktarının toplamıdır.

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \qquad (10)$$

Burada:
MB= kütle denkliği (%)
m_E = topraktan ve test kabından iki aşamalı olarak ekstrakte edilen test maddesinin toplam kütlesi (µg);
C_0 = Toprakla temas halinde olan başlangıçtaki maddenin kütle derişimi (µg cm^{-3});
V_{rec} = dengede geri kazanılan süpernatantın hacmi (cm^{-3}).

2.2. Desorpsiyon

Desorpsiyon (D) test koşullarında adsorbe olan test maddesinin başlangıçta adsorbe olan miktarına göre olan yüzdesidir.

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

Burada:
$D_{t\,i}$ = ti zamanındaki desorpsiyon yüzdesi (%);
m_{aq}^{des} (t i) = test maddesinin ti anında topraktan desorbe olan miktarı (µg);
m_s^{ads}(eq) = test maddesinin adsorpsiyon dengesinde adsorbe olan kütlesi (µg).

Desorpsiyon yüzdesi D_{ti}'nin paralel ve seri yöntemler için nasıl hesaplanacağına ilişkin ayrıntılı bilgi EK-V'te verilmiştir.

Test koşullarında görünür desorpsiyon katsayısı (K_{des}) toprak fazında kalan maddenin miktarı ve sulu çözeltide desorbe olan kütle konsantrasyonunun desorpsiyon dengesine ulaşıldığındaki oranıdır.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)\ V_T}{m_{aq}^{des}(eq) \qquad m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (12)$$

Burada:
K_{des} = desorpsiyon katsayısı ($cm^3\ g^{-1}$);
$m_{aq}^{des}(eq)$ = dengede topraktan desorbe olan toplam test maddesi kütlesi (µg)
V_T = Desorpsiyon kinetiği testinde toprakla temas halinde olan sulu fazın toplam hacmi (cm^3).
$m_{aq}^{des}(eq)$hesaplamak için yol gösterici bilgiler desorpsiyon başlığı altında EK-V'te verilmiştir.

Uyarı
Eğer önceki adsorpsiyon testi paralel yöntemle yapılmışsa eşitlik (12)'deki V_t , V_o' a eşit kabul edilebilir.

2.2.1. Desorpsiyon izotermleri

Freundlich desorpsiyon izoterm denklemleri test maddesinin toprakta adsorplanmış olarak kalan miktarı ve test maddesinin desorpsiyon dengesinde çözeltideki miktarını ilişkilendirir (eşitlik 16).

Her test tüpü için, maddenin toprakta desorpsiyon dengesinde adsorbe olarak kalan kısmı

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \qquad (13)$$

aşağıdaki gibi hesaplanır.
Burada:

$m_{aq}^{des}eq$,

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A} (\mu g) \qquad (14)$$

şeklinde tanımlanır.

Burada:

$C_s^{des}(eq)$ = test maddesinin desorpsiyon dengesinde toprakta adsorplanmış olarak kalan miktarı (µg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = desorpsiyon dengesinde sulu fazda analitik olarak belirlenen maddenin kütlesi (µg);

m_{aq}^{A} = test maddesinin yetersiz hacim değiştirilmesi nedeniyle adsorpsiyon dengesinde kaybedilen miktarı (µg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = adsorpsiyon dengesinde test maddesinin çözeltideki kütlesi (µg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (15)$$

V_r^F = Test maddesinin ölçümü için desorpsiyon dengesinde test tüpünden ölçüm için alınan hacim (cm^3);
V_R = Adsorpsiyon dengesine ulaşılmasından sonra alınan ve eşdeğer hacimde 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi ile değiştirilen süpernatant hacmi (cm^3)

Freundlich desorpsiyon eşitliği denklem 16'da verilmiştir.

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \qquad (16)$$

Ya da doğrusal halde:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \qquad (17)$$

şeklindedir.

Burada:
K^F_{des} = Freundlich desorpsiyon katsayısı
n = regresyon sabiti
$C_{aq}^{des}{}_{(eq)}$ = desorpsiyon dengesindeki maddenin sulu fazdaki kütle konsantrasyonu ($\mu g\ cm^{-3}$).

Eşitlik (16) ve (17) grafiğe geçirilebilir ve K_{Fdes} and 1/n eşitlik 17'yi kullanarak regresyon analizinden hesaplanabilir.

Açıklama:

Eğer Freundlich adsorpsiyon veya desorpsiyon üsteli 1/n 1'e eşitse, Freundlich adsorpsiyon veya desorpsiyon bağlanma sabiti (K^F_{ads} ve K^F_{des}) adsorpsiyon veya desorpsiyon denge sabitine eşit olur ve C_s 'ye karşı C_{aq} grafikleri doğrusal olur. Eğer bu üsteller 1'e eşit değilse, C_s'ye karşı C_{aq} grafikleri doğrusal olmaz ve adsorpsiyon veya desorpsiyon sabitleri izotermler boyunca değişir.

2.2.2. Test Raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir.

Aşağıdakileri içerecek şekilde kullanılan toprak örneklerinin bütünüyle tanımlanması:

- Bölgenin coğrafi referansı (enlem, boylam)
- Örnekleme tarihi
- Kullanım biçimi (örn. tarımsal toprak, orman, vb.)
- Örnekleme derinliği
- Kum/alüvyon/kil içeriği
- pH değerleri (0.01 M $CaCl_2$ içinde)
- Organik karbon içeriği

- Organik madde içeriği
- Azot içeriği
- C/N oranı
- Katyon değiştirme kapasitesi (mmol/kg);
- Örneklerin toplanması ve saklanması ile ilgili tüm ilgili bilgiler
- Gerekli olduğunda test maddesinin adsorpsiyon/ desorpsiyonuna ilşikin tüm ilgili bilgiler
- Her değişkenin belirlenmesinde kullanılan yöntemin referansı
- Deney sıcaklıkları
- Santrifüj koşulları
- Test maddesinin analizi için kullanılan analitik işlem
- Test bileşiğinin stok çözeltilerini hazırlamak için herhangi bir çözünürleştirici ajanın
- kullanılması için doğrulama
- Hesaplamalardaki düzeltmelerin eğer yapıldıysa açıklaması
- Ek-VI'ya göre hazırlanmış veri kâğıdına göre veriler ve grafiksel gösterimleri
- Sonuçların değerlendirilip yorumlanmasına ilişkin tüm bilgi ve gözlemler

3. KAYNAKLAR

(1) Kukowski H. and Brümmer G. (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O. Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the 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.

(6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS 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 198 8): 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, pp. 83 -122.
(14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 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), 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, 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, 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, 901-932.
(21) Guth J.A. Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 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, 269- 273.
(23) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylam ino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 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, 961 -971.
(25) Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci. 4, 247–258.
(26) Guth J.A. (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. —Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 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), pp. 135–172, Plenum Press, NY.
(28) Helling C.S. (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 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, 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, 37 -44.

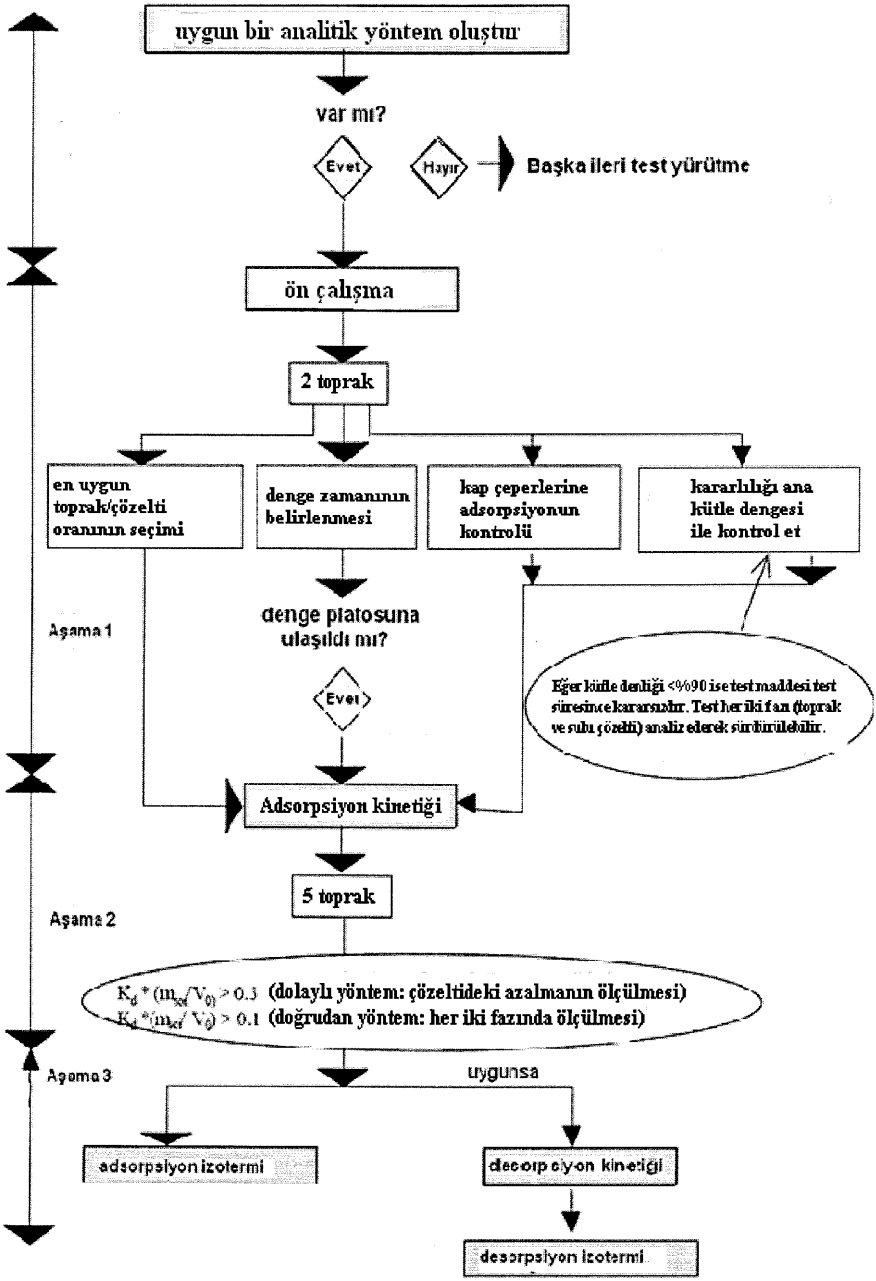
(31) Cohen S.Z. Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297–325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
(32) Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 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, 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, 389-395.
(35) Green R.E., and Karickoff 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,pp.80–101,
(36) Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem. 15, 572–576.
(37) Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667 -668.
(38) Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 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, 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, 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, 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, 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, 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, pp. 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, 454–457.
(48) Haues M.H. B. Stacey M., and Thompson J.M., (196 8) "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 edit ion.
(52) Black, Evans D.D. White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
(53) TS ISO/ DIS 10381–1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling progr ammes.
(54) TS ISO/DIS 10381–2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
(55) TS ISO/DIS 10381–3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
(56) TS ISO/DIS 10381–4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigatio n of natural and cultivated soils.
(57) TS ISO/DIS 10381–5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination Of urban and industrial sites.
(58) TS ISO 10381–6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, han dling 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, 353 -354.
(60) Grover R. and Hance R.J. (1970), "Effec t of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine".Soil Sci., 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, 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), 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), 227 -231.
(66) Gerstl Z. and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 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), 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, octanolwater partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78–115, ASTM STP 707, Philadelphia.
(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". Science, Vol. 206, 831–832.
(71) Hassett J.J. Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of /-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 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 - reactivité. Revue de l'Agric., 34 (4), 319-322.
(74) Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". Chemosphere, 32(12), 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), 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), 2341- 2352.
(77) Hance, R.J. (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". Weed Research, Vol. 7, pp. 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, pp.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, 14 -32.
(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), "Studies in adsorptio n: 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), "Adso rption 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).

Ek-I

Test şeması



Ek-II

Analitik yöntemin doğruluğu ve derişim değişimlerin adsorpsiyon sonuçlarına olan etkisi

Tablo (84)' dan çözelti içindeki test maddesinin başlangıç kütlesi (m_0=110 µg) ve denge kütlesi ($m_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$ =100 mg) arasındaki farkın çok küçük olduğu görülmektedir. Denge konsantrasyonlarının ölçümündeki %5'lik hata toprağa adsorplanan maddenin kütle hesabında %50 (m_s^{ads}(eq)) ve Kd'nin hesaplanmasında ise %52.4 hataya sebep olur.

Toprağın kültlesi m_{soil} = 10 g, Çözelti hacmi V_o = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	A = 9% İCİN							
m_0 = 110 µg or C_0=1.100 µg / cm^3	100	1.000	doğru değer	10	1.00	doğru değer	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%
	A = 55% İCİN							
m_0= 110 µg or C_0=1.100µg/cm^3	50.0	0.500	doğru değer	60.0	6.00	true value	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%
	A = 99% İCİN							
m_0 = 110 µg or C_0=1.100 µg / cm^3	1.100	0.011	doğru değer	108.9	10.89	doğru değer	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%

$$*m_s^{ad}(eq)=m_0-m_s^{ad}(eq), C_s^{ads}(eq)=\frac{[C_0-C_s^{ads}(eq)]V_0}{m_{soil}}\cdot Kd=\frac{m_s^{ad}(eq)}{m_s^{ad}(eq)}\frac{V_0}{M_{soil}}$$

$m_s^{ads}{}_{(eq)}$ = toprak fazında dengedeki test maddesi kütlesi, µg.
$m_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$ =sulu fazda dengedeki test maddesi kütlesi, µg.
$C_s^{ads}{}_{(eq)}$ = toprak fazında dengedeki test maddesi içeriği, µg g^{-1};
$C_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$ = sulu fazda dengedeki test maddesinin kütle konsantrasyonu µg cm^{-3};
R = $m_{aq}^{ads}{}_{(eq)}$ değerinin belirlenmesindeki analitik hata
R‡ = Analitik hata R'ye göre hesaplanan hata

Ek-III

k_d için hesaplama teknikleri

1. Hesaplama teknikleri K_d'nin Pow değerleri (12)(39)(63 -68), suda çözünürlük verileri (12)(19)(21)(39)(68 -73), veya HPLC üzerinde ters faz uygulanması ile elde edilen polarlık verileri (74 -76) ile hesaplanmasına olanak sağlar. Tablo 1 ve 2'de gösterildiği gibi K_{oc} ve K_{om} değerleri bu denklemlerden hesaplanır ve daha sonra Kd buradan dolaylı olarak hesaplanır.

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Bu ilişkilendirmeler temel olarak iki varsayıma dayanır:

(1) Test maddesinin adsorpsiyonunu etkileyen temel olarak toprağın organik karbon içeriğidir.
(2) Etkileşimler temel olarak polar olmayan etkileşimlerdir.

Sonuç olarak bu ilişkiler:

(1) polar maddelere uygulanabilir değildir ya da ancak bir miktar uygulnabilir
(2) toprağın organik madde içeriği çok azsa uygulanamaz (12).

Bunlara ilave olarak, P_{ow} ve adsorpsiyon arasında tatminkâr ilişkiler bulunmuşsa da (19), aynı şey adsorpsiyon miktarı ve sudaki çözünürlük için söylenemez (19)(21); buna ilişkin bugüne dek yürütülen çalışmalar çok çelişkilidir.

3. Adsorpsiyon katsayısı ve oktanol-su dağılım katsayısı arasındaki ilişkilere bazı örnekler ve suda çözünürlük ile ilgili örnekler tablo 1 ve tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Adsorpsiyon dağılım katsayısı ve oktanol-su dağılım katsayısı arasındaki ilişkiler ve başka örnekler için bkz (12) (68).

Maddeler	İlişkiler	Yazarlar
dallanmış üreler	$\log K_{om} = 0.69 + 0.52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatik klorlu bileşikler	$\log K_{oc} = - 0.779 + 0.904 \log P_{ow}$	Chiou *et al.* (1983) (65)
çeşitli pestisitler	$\log K_{om} = 4.4 + 0.72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
aromatik hidrokarbonlar	$\log K_{oc} = -2.53 + 1.15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tablo 2. Adsorpsiyon dağılım katsayısı suda çözünürlük ile ilgili örnekler başka örnekler için bkz (68) (69).

Bileşikler	İlişkiler	Yazarlar
Çeşitli pestisitler	$\log K_{om} = 3.8 - 0.561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Alifatik, aromatik, klorlu bileşikler	$\log K_{om} = (4.040 +/- 0.038) - (0.557 +/- 0.012) \log S_w$	Chiou *et al.* (1979) (70)
α - naftol	$\log K_{oc} = 4.273 - 0.686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Halkalı, alifatik, aromatik maddeler	$\log K_{oc} = - 1.405 - 0.921 \log S_w - 0.00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Çeşitli bileşikler	$\log K_{om} = 2.75 - 0.45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

Ek-IV

Santrifüj koşullarını açıklayan hesaplamalar

1. Santrifüj zamanı parçacıklar küresel kabul edilerek aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Burada basitleştirmek için birimler SI yerine CGS birim sisteminde verilmiştir (g, cm).
Burada:

ω = açısal hız (=2 rpm/60), rad s^{-1};
rpm = dakika başına dönüş sayısı;
η = çözeltinin vizkositesi, g s^{-1} cm^{-1};
r_p = parçacık yarıçapı, cm;
ρ_s = toprak yoğunluğu, g cm^{-3};
ρ_{aq} = çözelti yoğunluğu, g cm^{-3};
R_t = santrifüj rotorunun merkezinden santrifüj tüpünün tepesine olan uzaklık cm;
R_b = santrifüj rotorunun merkezinden santrifüj tüpünün tabanına olan uzaklık cm;
R_b-R_t = toprak/çözelti karışımının santrifüj tüpündeki uzunluğu, cm.

Tamamen ayırmayı sağlayabilmek için, pratikte bulunan zaman değerinin 2 katı kullanılır.

2. eşitlik (1) çözeltinin vizkositesi (η) ve çözeltinin özkütlesi (ρ_{aq}) suyun 25 °C deki değerlerine eşit kabul edilerek basitleştirilebilir;

$\eta = 8.95 \times 10^{-3}$ g $s^{-1}cm^{-1}$ and $\rho_{aq} = 1.0$ g.cm^{-3}

Bu şekilde santrifüj zamanı eşitlik 2'den hesaplanabilir.

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

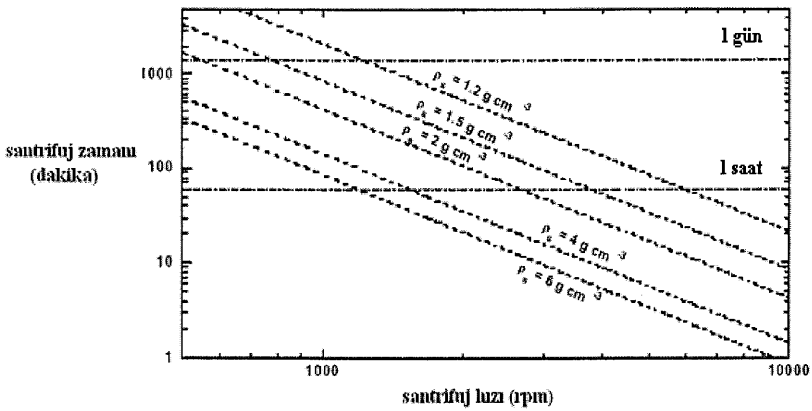
3. Eşitlik (2)'den santrifuj koşullarınını tanımlamak ve istenilen ölçekte ayırma sağlayabilmek için (0.1 µm yarıçapta) 2 koşulun önemli olduğu ortaya çıkar; (1) toprağın yoğunluğu ve (2) karışımın santrifüj tüpündeki uzunluğu ($R_b - R_t$), örn. çözeltinin üst kısmındaki toprak partikülleri ile dibindeki toprak partikülleri arasındaki mesafedir; daha açık bir ifadeyle sabit bir hacim için, tüp içindeki karışımın uzunluğu, tüpün yarıçapının karesine bağlı olacaktır.

(1) toprağın özkütlesi (2) santrifüj tüpünde karışımın boyu (Rb-Rt),

4. Şekil 1 farklı toprak yoğunluklarında (Şekil.1a) ve santrifüj tüpündeki farklı karışım uzunlukları (Şekil.2a) için santrifüj zamanı ve santrifüj hızı arasındaki değişkenlikleri özetler. Şekil 1a'dan toprak yoğunluğunun etkisi çok açıktır. Örneğin 3000 rpm'lik klasik bir santrifüjde 1.2 g/cm^3 toprak yoğunluğu için zaman yaklaşık 240 dakika, 2.0 g/cm^3 içinse sadece 50 dakikadır. Benzer şekilde şekil 1 b'den 10 cm uzunluk için zaman 50 dak. 1 cm

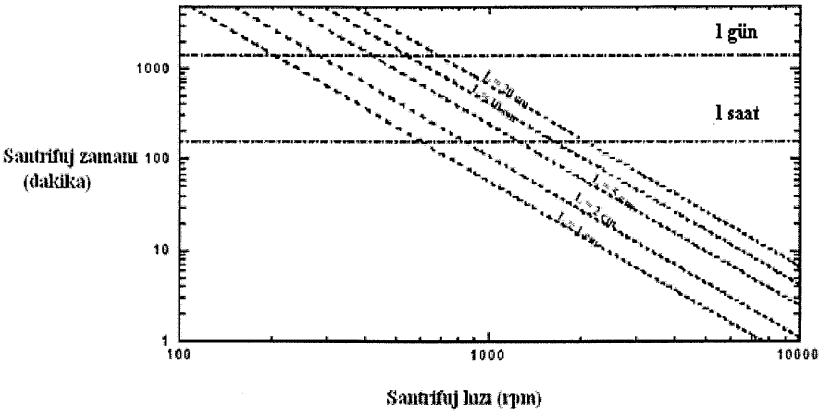
içinse sadece 7 dakikadır. Ancak mümkün olan en az uzunluk gerektiren ve santrfifüj sonrası deneycinin fazları en kolay ayırması için en uygun santrifüj ilişkisinin bulunması önemlidir.

5. Daha ötesi toprak/çözelti fazlarının ayrılması için deneysel koşulları tanımlarken, üçüncül bir yalancı faz, kolloid fazı, göz önünde tutmak gereklidir. 0.2 □m'den daha düşük parçacık büyüklüğüne sahip olan bu parçacıklar toprak süspansiyonuna adsorpsiyonun mekanizmasında çok önemli bir etkiye sahip olabilir. Yukarıda açıklandığı şekilde santrifüj edildiğinde, kolloidler sulu fazda kalır ve sulu fazla birlikte analize tabi tutulur. Bu yüzden onların etkisine ilişkin bilgi kaybolur. Eğer deneyi gerçekleştiren labaratuvar ultrasantrifüj cihazına sahipse adsorpsiyon/desorpsiyon çalışmaları test maddesinin kolloidlere olan adsorpsiyonunu içerecek şekilde daha detaylı çalışılabilir. Bu durumda 60,000 rpm/dakikalık ya da filtre gözenekliği 100,000 Dalton olan ultrafiltrasyon bu üç fazı birbirinden ayırmak için uygulanabilir. Test protokolu bu 3 fazın analize tabi tutulabilmesi için buna göre değiştirilmelidir.



Şekil. 1a. Santrifüj zamanının farklı toprak yoğunlukları ile değişimi

R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8.95 x 10-3g $s^{-1}cm^{-1}$ ve ρ_{aq} = 1.0 g.cm-3 25 °C'de.

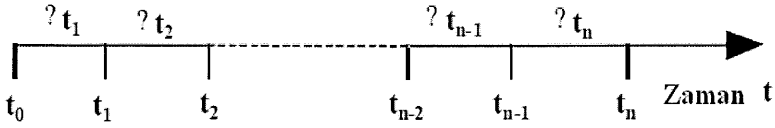


Şekil 1b. Santrifüj zamanının farklı uzunluklarda tüp boylarında santrifüj hızı ile değişimi (R_b -R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8.95 x 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$, ρ_{aq} = 1.0 g.cm^{-3}25 °C ve ρ_s = 2.0 g cm^{-3}.

Ek-V

Adsorpsiyon a (%) ve desorpsiyon d (%) hesaplaması

İşlemin zaman ölçeği aşağıdaki gibidir.



Bütün hesaplamalar için test maddesinin kararlı olduğu ve kabın duvarlarına adsorplanmadığı varsayılır.

ADSORPSİYON A (%A)

a) Paralel Yöntem

Her bir test tüpünde (i) her t_i zamanında yüzde adsorpsiyon aşağıdaki denklemden hesaplanır.

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \qquad (1)$$

Bu eşitlikteki terimler aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

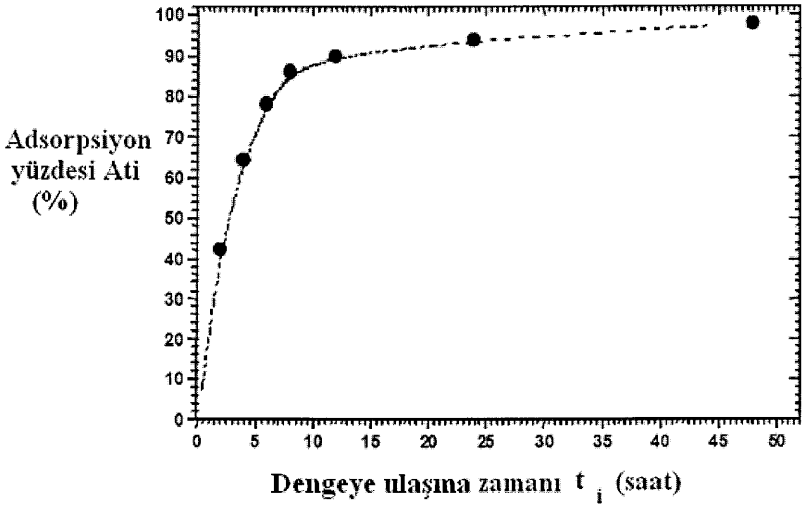
$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

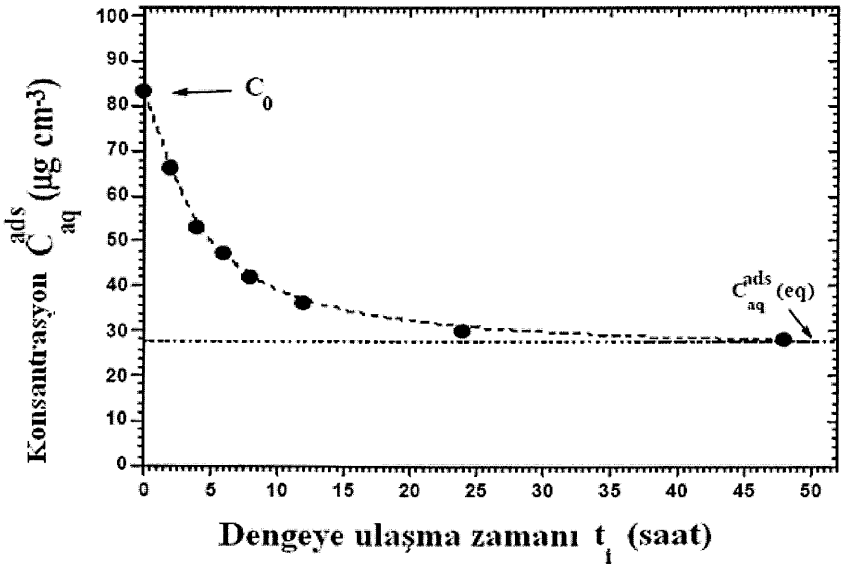
Burada:

$A_{ti} = t_i$ (%) anındaki adsorpsiyon yüzdesi (%)
$m_s^{ads}(t_i)$ = toprağa t_i zamanında adsorplanan test maddesinin kütlesi (µg);
m_0 =test tüpünde başlangıçtaki test maddesi kütlesii (µg)
C_0 = toprakla temastaki test çözeltisinin başlangıç konsantrasyonu (μgcm^{-3})
$C_{aq}^{des}{}_{(ti)}$ = test maddesinin analizin gerçekleştirildiği t_i anındaki sulu fazdaki kütle konsantrasyonu (μgcm^{-3}); bu konsantrasyon kör analizi ile elde edilen değerler dikkate alınarak analitik olarak belirlenir.
V_0 = toprakla temas halinde olan çözeltinin ilk hacmi (cm^3).

Adsorpsiyon yüzdesi At_i ya da $C_{aq}^{ads}{}_{(ti)}$ zamana karşı grafiğe geçirilir ve tutunma dengesi sağlandığındaki zaman buradan belirlenir. Buna ilişkin grafikler Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 1. Adsorpsiyon dengesi grafiği



Şekil 1. Test maddesinin sulu fazdaki kütle konsantrasyonu (C_{aq}) zaman grafiği

b) Seri Yöntem

Aşağıdaki eşitlikler adsorpsiyon işleminde test maddesinin küçük hacimlerinin belli zaman aralıklarında ölçümünü esas alır. Her bir zaman aralığında toprak tarafından adsorplanan madde miktarı aşağıdaki gibi hesaplanır.

İlk zaman aralığını için :$\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

İkinci zaman aralığı için: :$\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

Üçüncü zaman aralığı için: :$\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

n'nci zaman aralığı için: :$\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

her bir zaman aralığıdanki yüzde adsorpsiyon $A\Delta t_i$

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

denkleminden hesaplanırken, t_i anındaki yüzde adsorspiyon;

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

denkleminden hesaplanır.

Ati ve AΔti adsorpsiyon değerleri (çalışmanın gereklerine göre) tutunma dengesi zamanı belirlendikten sonra zamana karşı grafiğe geçirilir.

Denge zamanı t_{eq} de

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

toprağa tutunan test maddesi kütlesi:

Çözeltideki test maddesi miktarı:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

Dengedeki yüzde adsorpsiyon

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

şeklinde ifade edilir.

Yukarıda ifade edilen parametreler:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \ldots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = sırasıyla Δt_1, Δt_2 ,..., Δt_n zaman aralıklarında toprağa tutunan madde miktarı (µg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \ldots, m_n^{ads}(t_n)$ = sırasıyla t_1, t_2, t_n anlarında küçük hacimde sıvı çözelti v_a^A da ölçülen madde kütlesi (µg);

$m_s^{ads}(eq)$ = Dengede toprağa adsorplanan test maddesi miktarı (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = Dengede sulu fazdaki test maddesi miktarı (µg);

v_a^A = Test maddesinin ölçüldüğü alikuot hacmi (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = Δt_i aralığındaki adsorpsiyon yüzdesi (%)

A_{eq} = adsorpsiyon dengesindeki adsorspiyon yüzdesi, %

DESORPSİYON D (%)

Desorpsiyon kinetiği deneyin başlatıldığı zaman t_o test maddesi çözeltisinin en fazla geri kazanılan hacminin (adsorpsiyon dengesine ulaşıldıktan sonra) eşit miktarda 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi ile yerdeğiştirdiği an olarak kabul edilir.

a) Paralel yöntem

t_i noktasında test maddesinin sulu fazda ölçülen miktarı i (V_r^i) tüpünden alınan hacimde ölçülür ve kütle aşağıdaki denkleme göre hesaplanır.

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \qquad (13)$$

adsorpsiyon dengesinde $t_i=t_{eq}$ dir dolayısıyla; $m_{aq}^{des}(t_i)=m_{aq}^{des}(eq)$ olur.

Δt_i zaman aralığında desorbe edilen maddenin kütlesi

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{i=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \qquad (14)$$

eşitliği ile verilir.

Desorpsiyon yüzdesi ti anında:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

Δt_i anında ise;

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

Eşitliği ile verilir.

D_{ti}	Ti anındaki desorpsiyon yüzdesi	%;
$D\Delta_{ti}$	Δ_{ti} zamanına karşılık gelen desorpsiyon yüzdesi	%;
$m_{aq}^{des}(t\ i)$	t_i anında topraktan desorbe olan maddenin kütlesi	µg;
$m_{aq}^{des}(\Delta ti)$	Δt_i aralığında topraktan desorbe olan maddenin kütlesi	µg;
$m_m^{des}{}_{(ti)}$	t_i anında analiz için alınan çözelti hacminde analitik olarak ölçülen test maddesi kütlesi (µg);	
m_{aq}^{A}	Yetersiz hacim değişimi nedeniyle adsorpsiyon dengesinde kalan madde kütlesi (µg);	

$m_{aq}^{des}(eq)$	Desorpsiyon dengesinde çözeltideki test maddesinin toplam kütlesi	µg
V_R	Adsorpsiyon dengesine ulaştıktan sonra test tüpünden alınan ve aynı hacimde 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi ile yerdeğiştiren süpernatantın hacmi	cm^3
V_r^1	Tüp (i) 'den desorpsiyon kinetiği deneyinde ölçüm için alınan test çözeltisinin hacmi	cm^3

b) Seri Yöntem

Aşağıdaki eşitlikler sıvı fazın küçük hacimlerdeki test maddesinin (V_a^A) ölçümüne dayandığı adsorpsiyon işlemini dikkate alır (Seri yöntem bakınız 1.9).

Burada (a) adsorpsiyon kinetiği deneyinden sonra süpernatantın aynı hacimde 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi (V_R) ile yer değiştirdiğini ve b) desorpsiyon kinetiği deneyinde toprakla temas halinde olan sulu fazın toplam hacminin (V_T) deney boyunca sabit olduğunu ve aşağıdaki eşitlikle verildiğini dikkate alır.

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

t_i anında test maddesinin miktarı az bir alikuotta (V_a^D) ölçülür ve desorbe edilen kütle aşağıdaki denkleme göre hesaplanır.

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1)\cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \qquad (19)$$

desorpsiyon dengesinde $t_i = t_{eq}$dir dolayısıyla ; $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ olur.

Yüzde desorpsiyon D_{ti} aşağıdaki denklemden hesaplanır.

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (20)$$

İlk zaman aralığı $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ için :

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

ikinci zaman aralığı $\Delta t_2 = t_2 - t_1$ için:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

and

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

n.'nci zaman aralığı $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$ için

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n=1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ and}$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n=1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

her bir zaman Δ_{ti} aralığıdanki yüzde desorpsiyon $D_{\Delta ti}$

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

Ve t_i anında yüzde desorpsiyon Dt_i

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

Yukarıda ifade edilen parametreler:

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), \ldots, m_s^{des}(\Delta t_n)$ = sırasıyla Δt_1, Δt_2 ,..., Δt_n zaman aralıklarından sonra toprakta adsorbe olarak kalan madde miktarı (µg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), \ldots, m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = sırasıyla Δt_1, Δt_2 ,..., Δt_n anlarında desorbe olan test maddesi kütlesi (µg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$, ... ,$m_m^{des}(t_n)$ = sırasıyla t_1, t_2,.....t_n, anlarında alikuot (V_a^D) içinde ölçülen test maddesi kütlesi (µg).

V_T ; seri metodla yürütülen desorpsiyon kinetiği deneyi süresince toprakla temas halinde olan sulu fazın toplam hacmi (cm^3)

m_{aq}^A ;Yetersiz hacim değişimi nedeniyle adsorpsiyon dengesinde kalan madde kütlesi (µg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R; Adsorpsiyon dengesine ulaştıktan sonra test tüpünden alınan ve 0.01 M $CaCl_2$ çözeltisi ile yerdeğiştiren süpernatantın hacmi (cm^3)

v_a^D; Seri yöntemle yürütülen desorpsiyon kinetiği deneyi sırasında analitik amaçla tüpden (i) alınan alikuot örnek hacmi (cm^3)

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \qquad (27)$$

Ek-VI

Toprakta adsorpsiyon-desorpsiyon: veri raporlama formları

Test edilen madde.....
Test edilen toprak.....
Toprağın kuru kütlesi (%)(105 °C, 12 saat) .....
Sıcaklık (°C).....

Tartılan toprak	g	
Toprak: Kuru kütle	g	
$CaCl_2$ çözeltisinin hacmi	cm^3	
Son çözeltinin nominal derişimi	$\mu g/cm^3$	
Son çözeltinin analitik derişimi	$\mu g/cm^3$	

Kullanılan analitk yöntemin ilkesi.....
Analitik yöntemin kalibrasyonu.....
Test edilen madde.....
Test edilen toprak.....
Toprağın kuru kütlesi (%)(105 °C, 12 saat) .....
Sıcaklık.(°C).....
Takip edilen analitik metodoloji

Doğrudan ☐ Dolaylı ☐ Paralel ☐ Seri ☐

Kullanılan analitk yöntemin ilkesi	
Analitik yöntemin kalibrasyonu	
Test edilen madde	
Test edilen toprak	
Toprağın kuru kütlesi (105 °C, 12 saat).....	....%
Sıcaklık.....	....°C
Takip edilen analitik metodoloji:	Doğrudan ☐ Dolaylı ☐ Paralel☐ Seri☐

Adsorpsiyon testi: Test Örnekleri

	Sembol	Birimler	Denge Zamanı		Denge Zamanı		Denge Zamanı		Denge Zamanı	
tartılan toprak	-	g								
Toprak: kuru kütle	m_{soil}	g								
Tartılan topraktaki su hacmi(hesaplanan)	V_{WS}	cm^3								
toprağı dengeleyen 0.01 M CaCl2 çözeltisinin hacmi		cm^3	-							
stok çözeltinin hacmi		cm^3								
toprakla temasta olan sulu fazın toplam hacmi	V_0	cm^3								
Test çözeltisinin başlan-langıç konsantrasyonu	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
testin başındaki test maddesi kütlesi	m_0	µg								
karıştırma ve santrifuj sonrası										
dolaylı yöntem										
paralel yöntem										
Sulu fazda Kör düzeltmesi iceren test maddesi konsantrasyonu	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Seri Yöntem										
Alikuot içinde ölçülen test maddesi kütlesi VaA	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
Doğrudan yöntem										
toprağa adosrbe olan test maddesi kütlesi	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adsorpsiyonun hesabı										
Adsorpsiyon ortalamaları	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Adsorpsiyon katsayısı	K_{ad}	$cm^3\ g^{-1}$								
ortalamalar										
Adsorpsiyon katsayısı	Kad	$cm^3\ g^{-1}$								

Test edilen madde.....
Test edilen toprak.....
Toprağın kuru kütlesi (%)[105 °C, 12 saat) .....
Sıcaklık (°C).....

Adsorpsiyon testi: Kör ve Kontrol

Sembol	birimler	Kör		Kör		Kontrol	
Tüp N°							
Tartılan topraklar	g					0	0
tartılan topraktaki su içeriği(hesaplanan)	cm^3					-	-
Eklenen 0.01 M CaCl2 çözelti hacmi	cm^3						
eklenen test maddesi stok çözeltisi hacmi	cm^3	0	0				
Sulu fazın toplam hacmi (Hesaplanan)	cm^3					-	-
test maddesinin sulu fazdaki ilk konsantrasyon	$\mu g\ cm^{-3}$						
Karıştırma ve santrifüj sonrası							
Sulu fazdaki konsantrasyon	$\mu g\ cm^{-3}$						

Not: Gerekirse kolon ekle.

Test edilen madde.....
Test edilen toprak.....
Toprağın kuru kütlesi (%)[105 °C, 12 saat) .....
Sıcaklık (°C).....

Kütle denkliği

	Sembol	birimler				
Tüp numarası						
tartılan toprak	-	g				
Toprak: kuru kütle	$m_{s_{od}}$	g				
tartılan topraktaki su hacmi(hesaplanan)	$V_{w's}$	ml				
Toprağı dengeye getiren 0.01M CaCl2 hacmi		ml				
Stok çözelti hacmi		cm^3				
sulu fazın toprakla temas eden toplam hacmi	V_0	cm^3				
Başlangıçtaki test çözeltisi konsantrasyonu	C_0	$\mu g\, cm^{-3}$				
Denge zamanı	-	h				
Karıştırma ve santrifuj sonrası						
Ads. dengesinde sulu fazda kör düzeltmesi içeren test maddesi konsantrasyonu	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\, cm^{-3}$				
Denge zamanı	teq	h				
Çözücü ile 1. Seyrelme						
Atılan sulu faz hacmi	V_{rec}	cm^3				
Eklenen çözücü hacmi	ΔV	cm^3				
Çözücü ile 1. ekstraksiyon						
Çözücüde analiz edilen sinyal	S_{E1}	var.				
çözücüde test maddesi konsantrasyonu	C_{E1}	$\mu g\, cm^{-3}$				
Test kabı duvarlarından ve topraktan ekstrakte edilen madde kütlesi	m_{E1}	µg				
Çözücü ile 2. Seyrelme						
Atılan sulu faz hacmi	ΔV_s	cm^3				
Eklenen çözücü hacmi	$\Delta V'$	cm^3				
Çözücü ile 2. ekstraksiyon						
Çözücüde analiz edilen sinyal	S_{E2}	var.				
çözücüde test maddesi konsantrasyonu	C_{E2}	$\mu g\, cm^{-3}$				
Test kabı duvarlarından ve topraktan ekstrakte edilen madde kütlesi	m_{E2}	µg				
İki aşamada ekstrakte edilen toplam test maddesi kütlesi	m_E	µg				
Kütle denkliği	MB	%				

Test edilen madde.....

Test edilen toprak.....

Toprağın kuru kütlesi (%)[105 °C, 12 saat) .....

Sıcaklık (°C).....

Adsorpsiyon izotermleri

	Sembol	Birimler								
Tüp no										
Tartılan toprak	-	g								
Toprak: Kuru Kütle	E	g								
Tartılan topraktaki su hacmi(hesaplanan)	V_{WS}	cm^3								
Dengeye ulaştırmak için 0.01 M CaCl2 hacmi		cm^3								
Eklenen stok çözelti hacmi		cm^3								
Toprakla temasta olan toplam sulu faz hacmi (hesaplanan)	V_0	cm^3								
Çözelti konsantrasyonu	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Dengeye varma zamanı	-	h								
Karıştırma ve santrifuj sonrası										
Kör düzeltmesi içeren sulu fazdaki madde konsantrasyonu	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Sıcaklık		°C								
Birim toprak başına adsorplanan kütle	$C_s^{ads}(eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Regresyon analizi

K_F^{ads} değeri

1/n değeri

Regresyon katsayısı: r^2

Test edilen madde.....
Test edilen toprak.....
Toprağın kuru kütlesi(%)[105 °C, 12 saat) .....
Sıcaklık.(°C).....
Takip edilen analitik metodoloji

Doğrudan ☐ Dolaylı ☐ Paralel ☐ Seri ☐

Desorpsiyon testi

		Sembol	Birimler	Zaman aralığı	Zaman aralığı	Zaman aralığı	Zaman aralığı
Adsorpsiyon basamağından gelen Tüp no							
Adsorpsiyon dengesinde toprağa adsorplanan madde kütlesi		$m_g^{ads(eq)}$	µg				
0.01 M CaCl2 ile yerdeğiştiren sulu faz hacmi		V_R	cm^3				
Toprakla temasta olan toplam sulu faz hacmi	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
yetersiz hacim değişimi sebebiyle adsorpsiyon dengesinde kalan test maddesi kütlesi		m_{aq}^{A}	µg				
Desorpsiyon kinetiği							
ti anında ölçülen topraktan desorbe olan madde kütlesi		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
tüp(i)'den alınan madde ölçümü için alınan test maddesi	PM	V_i^j	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
topraktan t2 anında desorbe olan madde kütlesi		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
maddeden Δt_i aralığında desorbe olan madde kütlesi		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				
Desorpsiyon yüzdesi							
ti anında desorpsiyon		D_{t_i}	%				
Δt_1 aralığında desorpsiyon		$D_{\Delta t_i}$	%				
Görünür adsopsiyon katsayısı		K_{des}					

PM: Paralel metod

SM: Seri metod

C.19 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) KULLANARAK TOPRAKTA VE KANALİZASYON ÇAMURUNDA ADSORPSİYON KATSAYISI (Koc) HESAPLANMASI

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG121 (2001) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Maddelerin toprakta ve kanalizasyon çamurundaki adsorpsiyon davranışları test yötemi C18'de açıklanan parameterler kullanılarak deneysel olarak belirlenebilir. Burada önemli bir parametre maddenin topraktaki/çamurdaki derişiminin sulu fazdaki adsorpsiyon denge derişimine oranı olarak tanımlanan adsorpsiyon katsayısıdır. Organik karbon içeriğine göre normalize edilmiş adsorpsiyon katsayısı Koc kimyasalın toprağın organik maddesine ve kanalizasyon çamuruna olan bağlanma kapasitesini tanımlayan bir belirteçtir ve farklı kimyasallar arasında karşılaştırma yapmaya olanak sağlar. Bu parametre sudaki çözünürlük ve oktanol/su dağılım katsayısı arasındaki ilişkilerden tahmini hesaplanabilir (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Bu testte açıklanan deneysel yöntem toprak yada kanalizasyon çamurunda adsorpsiyon katsayısının hesaplanması için HPLC kullanır (8). Buradaki tahmini hesaplamalar QSAR hesaplamalarına göre daha güvenilirdir(9).

Bir tahmini hesaplama yöntemi olarak C.18'de açıklanan seri denge deneylerinin yerini hiçbir zaman alamaz. Ancak tahmini hesaplanan Koc değeri test yöntemi C.18'de açıklananlara göre eşitlik 3'e göre Kd ve K_F'yi hesaplayarak uygun test parametrelerinin seçimi için kullanışlı olur.(bkz bölüm 1.2)

1.2. Tanımlar ve birimler

K_d: Test maddesinin sorbent (toprak veya kanalizasyon çamuru) ve sulu faz olmak üzere iki bileşenden oluşan sistemde maddenin bu fazlar arasındanki denge derişim oranıdır. Her fazdaki derişimler ağırlık/ağırlık bazına göre açıklanırsa birimsizdir. Sulu fazdaki derişim ağırlık/hacim bazında verilirse birimler $ml.g^{-1}$dir. Kd değeri sorbent özellikleri ile değişir ve derişime bağlı olabilir.

$$K_d = \frac{C_{toprak}}{C_{su}} \; veya \frac{C_{çamur}}{C_{su}}$$

burada:
C_{toprak} = Test maddesinin topraktaki denge derişimi ($mg.g^{-1}$)
$C_{çamur}$ = Test maddesinin çamurdaki denge derişimi ($mg \cdot g^{-1}$)
C_{su} = Test maddesinin sulu fazdaki denge derişimi ($mg.g^{-1}$, $mg.ml^{-1}$)

K_f: Freundlich adsorpsiyon katsayısı, test maddesinin denge derişimi C_{aq} sulu fazda 1'e eşitse test maddesinin toprakta yada lağım çamurunda derişimidir.(x/m) Birimi $mg.g^{-1}$'dir. Değeri sorbent özellikleri ile değişebilir.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \qquad (2)$$

burada:
x/m = test maddesinin dengede belli bir miktar sorbent m(g) üzerine adsorplanan miktarıdır x (µg).

1/n = Freundlich adsorpsiyon izoterminin eğimi
C_{aq}= Test maddesinin sulu fazdaki denge derişimidir. (µg . ml^{-1})

$$C_{aq} = 1; \quad \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

Koc: Organik karbon içeriğine (foc) göre normalize edilmiş Freundlich adsorpsiyon katsayısı (K_f) yada dağılım katsayısıdır (K_d). Özellikle iyonlaşamayan kimyasallar için yaklaşık adsorpsiyon miktarı için bir göstergedir ve farklı kimyasallar arasında karşılaştırma yapmaya olanak verir. K_F ve Kd'nin boyutlarına göre Koc birimsiz olabilir yada $ml.g^{-1}$ yada $mg.g^{-1}$ organik madde biriminde olabilir.

$$Koc = \frac{Kd}{foc} \text{ (birimsiz veya } ml \cdot g^{-1}) \text{ veya } \frac{Kf}{foc} \ (\mu g \cdot g^{-1})$$

Koc yada Kd arasındaki ilişki her zaman doğrusal değildir ve Koc değerleri topraktan toprağa değişir ve bu değişkenlik Kd ve Kf değerlerine göre oldukça düşüktür. Adsorpsiyon katsayısı Koc kapasite faktörü (k')'den seçilen referans maddeler kullanılarak log k''ye karşı log Koc

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad (4)$$

grafiği kullanılarak çıkarılabilir.

Burada ;
t_R : Test ve referans maddelerin HPLC'de alıkonulma zamanları (dakika)
t_0 : HPLC'de ölü zaman (dakika) (bkz bölüm 1.8.2).
P_{OW}: Oktanol-su dağılım katsayısı test maddesinin n-oktanol ve sudaki derişimlerinin oranıdır ve birimsiz bir değerdir.

$$Pow = \frac{C_{oktanol}}{C_{su}} = Kow$$

1.3. Referans maddeler

Yapısal formül, saflık ve ayrışma sabiti (uygunsa) yöntem kullanılmadan önce bilinmelidir. Sudaki çözünürlük ve organik çözücülerdeki çözünürlük ve oktanol-su dağılım katsayısı ve hidroliz karakteristiklerinin bilinmesi faydalı olur.

Ölçülen HPLC alıkonulma zamanı ve adsorpsiyon katsayısı arasında bir ilişki kurabilmek için, log Koc'ye log k kullanılarak bir kalibrasyon grafiği oluşturulmalıdır. En azından 6

referans noktası ve beklenen değerin bir altında ve bir üstünde bir değer kullanılmalıdır. Yöntemin doğruluğu eğer referans maddeleri test maddesine yapısal olarak yakın ise daha da iyileşir. Eğer bu tür veriler elde edilebilir değilse, uygun kalibrasyon maddelerin seçimi deneyi yapana kalmıştır. Bu durumda daha genel ve yapısal olarak heterojen bir madde kümesi seçilmelidir.

Maddeler ve karşılık gelen Koc değerleri Ekte kanalizasyon çamuru için Tablo 1'de toprak için Tablo 1'de verilmiştir. Diğer kalibrasyon standartlarının seçimi de gerekçelendirilmelidir.

1.4. Test yönteminin ilkesi

HPLC siyanopropil ve lifofilik ve polar gruplar bulunduran ticari silika kolonlarda gerçekleştirilir. Silika bazlı ve orta derecede polar bir matriks kullanılır.

– O – Si	– CH_2 – CH_2 – CH_2	– CN
silika	polar olmayan grup	polar grup

Test yönteminin ilkesi test yöntemi A.8'deki test yöntemine benzerdir. (Dağılım katsayısı, HPLC yöntemi)

Hareketli fazla birlikte kolondan geçerken, test maddeleri durağan faz ile etkileşir. Sabit faz ve hareketli faz arasında dağılım dolayısıyla test maddesinin kolondan çıkışı geciktirilir. Sabit fazın hem polar hemde apolar bölgeler içeren ikili yapısı nedeniyle, aynı topraktaki organik madde yada kanalizasyon çamuru matrikslerinde olduğu gibi hem polar hemde apolar maddeler ile etkileşimler mümkün olur. Bu kolondaki alıkonma zamanı ve organik maddenin üzerinde adsorpsiyon katsayısı arasında bir ilişki kurmayı sağlar. pH değeri polar maddelerin tutunma davranışları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Tarımsal topraklar yada atıksu rıtma tesislerinde pH normal olarak 5.5 ile 7.5 arasında değişir. İyonlaşabilen bileşikler için, uygun tampon çözeltiler ile hem iyonlaşabilen hem de iyonlaşmayan formlar için 2 test yürütülmelidir. Ancak bu test maddesinin %10 'nun pH 5.5 ve pH 7.5 arasında ayrıştığı durumlarda yapılmalıdır. Hesaplama için yalnızca HPLC kolonundaki, alıkonma ve adsorpsiyon katsayısı kullanıldığı için, nicel bir analitik yönteme ihtiyaç yoktur ve sadece alıkonma zamanının ölçümü gereklidir. Eğer uygun bir referans madde kümesi mevcutsa ve standard deney koşulları kullanılabiliyorsa, yöntem adsorpsiyon katsayısı Koc'nin hesaplanmasında uygun ve hızlı bir yol sağlar.

1.5. Test uygulanabilirliği

HPLC yöntemi uygun bir tayin sisteminin (spektrofotometre, radyoaktivite alıcısı) mevcut olduğu ve deney esnasında yeterince kararlı olduğu kimyasallar (etiketsiz veya etiketli) için uygulanabilir. Diğer deneysel sistemlerde çalışmanın zor olduğu kimyasallar için bu yöntem uygun olabilir, (örneğin uçucu maddeler, analitik olarak ölçülebilir bir derişimde suda çözünür olmayan, inkübasyon sistemlerine yüksek afinite gösteren maddeler gibi). Bu yöntem çözünmeyen geri yıkama elüsyon bantları veren karışımların analizinde kullanılabilir. Böyle

bir durumda test karışımındaki maddelerin log Koc değerlerinin üst ve alt sınırları belirtilmelidir. Safsızlıklar bazı durumlarda HPLC sonuçlarının yorumlanmasında problemlere yol açabilir, ancak bunlar analitik olarak açıkca tanımlanmışsa ve safsızlıklardan ayrılmışsa çok az öneme sahiptir. Yöntemin ekteki Tablo 1'deki maddeler için doğruluğu kanıtlanmıştır ve aşağıdaki kimyasal sınıfındaki diğer başka kimyasallara da uygulanmıştır.

- aromatik aminler (e.g. trifluralin, 4-kloroanilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, N-metilanilin,1-naftilamin);
– aromatik karboksilik asit esterleri (örneğin, benzoik asit metilesteri, 3,5-dinitrobenzoik asit etilesteri);
– aromatik hidrokarbonlar (toluen, ksilen, etilbenzen, nitrobenzen);
ariloksifenoksipropiyonik asit esterleri (örneğin dikloro-metil, fenoksiprop-etil, fenoksiprop-P-etil);
– benzimidazol ve imidazol fungisitler (örneğin karbendazim, fuberidazol, triazoksit);
–karboksilik asit amitler (örneğin 2-klorobenzamid, N,N-dimethilbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid);
– klorlu hidrokarbonlar (örneğin endosulfan, DDT, heksaklorobenzen, kuintozen, 1,2,3-triklorobenzen);
–organofosfor insektisitler (örneğin azinfos-metil, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos);
– fenoller (örnek fenol, 2-nitrofenol, 4-nitro fenol, pentakloro fenol, 2,4,6-triklorofenol, 1-naftol);
– fenilüre türevleri (örneğin isoproturon, monolinuron, pensikuron);
– pigment boyaları(örneğin Asit Sarısı 219, Bazik Mavi 41, Direk Kırmızı 81);
– çok halkalı armatik hidrokarbonlar (örneğin asetnaften, naftalin);
– 1,3,5-triazine herbisitler (örneğin prometrin, propazin, simazin, terbutrin);
- triazole türevleri (örneğin tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Bu yöntem durağan fazla yada elüsyon çözeltisi ile direkt olarak tepkime veren maddeler için uygulanabilir değildir. Bu yöntem ayrıca inorganik bileşenlerle özgün olarak etkileşen maddeler için uygulanabilir değildir. Yöntem yüzey aktif maddeler, inorganik bileşikler ve orta yada kuvvetli organik asitler yada bazlar için çalışmayabilir. 1.5 ten 5.0'e değişen log Koc değerleri belirlenebilir. İyonlaşabilen bileşikler tamponlanmış bir hareketli fazda ölçülmelidir ancak test maddesinin yada tampon bileşenlerinin çökmemesine dikkat edilmelidir.

1.6. Kalite kriterleri

1.6.1. Doğruluk

Normal olarak test maddesinin adsorpsiyon katsayısı seri denge yönteminden elde edilen değerden +/- 0.5 log birimi aralığında hesaplanabilir (bkz Ek Tablo 1). Daha yüksek doğruluk referans maddeleri test maddesiyle yapısal olarak ilişkiliyse elde edilebilir.

1.6.2. Tekrarlanabilirlik

Belirlemeler en azından 2 örnek üzerinde paralel olarak yapılmalıdır. Tek tek ölçümlerden elde edilen log Koc değerleri 0.25 log birimi aralığında olmalıdır.

1.6.3. Tekrar üretilebilirlik

Bu güne kadarki tecrübeler yöntemin uygulanabilirliğini destekleyicidir. Topraktaki Koc değerlerinin mevcut olduğu 48 maddeyi içeren (çoğunluğu pestisit) bir HPLC yönteminin analizi sonucu korelasyon katsayısı R = 0.95 (10) (11) olarak bulunmuştur. Yer alan 11 labaratuvarla laboratuvarlar arası bir karşılaştırma testi, yöntemi ve sonuçları iyileştirmEk-Ve onaylamak için yürütülmüştür (12). Sonuçlar Ekte Tablo 2'de verilmiştir.

1.7. Test yönteminin tanımlanması

1.1.1. Adsorpsiyon katsayısının ön belirlenmesi
Oktanol/su dağılım katsayısı Pow (= Kow) ve belli bir oranda da sudaki çözünürülük özellikle iyonlaşamayan bileşikler için adsorpsiyonun göstergesi olarak kullanılabilir ve dolayısıyla ön aralık bulmada kullanılabilir. Çeşitli grup kimyasallara için korelasyonlar yayınlanmıştır. (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.1. Düzenek

Pulslar halinde çalışmayan (düzgün çalışan) pompa takılı ve uygun bir alıcı aygıtına sahip bir sıvı kromatografi sistemi gereklidir. Enjeksiyon halkası içeren bir enjeksiyon valfinin kullanımı önerilir. Siyanopropil bağlı ticari silika bazlı reçineler (örnek Hypersil and Zorbax CN) kullanılmalıdır. Eneksiyon sistemi ve analitk kolon arasına bir koruyucu kolon yerleştirilebilir. Değişik üreticilerin kolonlarının ayırma etkinliği değişebilir. Yol gösterici olarak aşağıdaki kapasite faktörlerine ulaşılmalıdır.

log Koc = 3.0 için log k'> 0.0 yada log Koc = 2.0 için log k' > - 0.4 metanol/water 55/45 hareketli faz.

1.7.2. Hareketli fazlar

Çeşitli hareketli fazlar test edilmiştir ve aşağıdakiler önerilir.

– metanol/su (55/45% v/v)
– metanol/0.01M sitrat-tamponu pH 6.0 (55/45% v/v)

Geri elüsyon çözücüsünü hazırlarken HPLC saflığında metanol ve damıtık su yada sitrat tamponu kullanılır. Karışımın kullanım öncesi gazı alınır. İzokratik (tek çözücü derişim akışı veren) bir elüsyon tercih edilmelidir. Eğer metanol/su karışımı uygun değilse diğer organik çözücü/su karşımları örenğin etanol/su yada asetonitril/su denenebilir. İyonlaşabilen bileşikler için pH'ı kararlı kılmak için tamponun kullanımı önerilir. Tuz çökmemesi ve kolon kötüleşmemesine dikkat edilir. Bunlar bazı organik faz/tampon karışımlarında oluşabilir. İyon çiftleştirici reaktifler kullanılmamalıdır çünkü bunlar sabit faza tutunma davranışlarını engeller. Sabit fazdaki bu tür değişimler tersinmezdir. Bu yüzden deneyleri ayrı kolonlarda gerçekleştirmek zorunluluğu doğar.

1.7.3. Çözünenler

Test ve referans maddeleri hareketli fazda çözünmelidir.

1.8. Testin performansı

1.8.1. Test koşulları

Test süresince sıcaklıklar ölçülmelidir. Sıcaklık kontrollu bir kolon bölümünün kullanımı, kalibrasyon ve hesaplama deneylerinde ve test maddelerinin ölçümlerinde sabit koşulları sağlamak için önerilir.

1.8.2. Ölü zaman t_0' ın belirlenmesi

Ölü zamanın belirlenmesi için iki farklı yöntem kullanılabilir.(ayrıca bkz bölüm 1.2)

1.8.2.1. Ölü zamanın t_0 homolog seriler aracılığı ile belirlenmesi

Bu yöntemin güvenilir ve standardlaşmış veriler verdiği kanıtlanmıştır. Detaylar için A-8 Test Yöntemi: Dağılım Katsayısı (n-oktanol/su) HPLC yöntemi

1.8.2.2. Ölü zamanın t_0 kolonda tutunmayan inert maddeler ile tayini

Bu teknik formamit, üre yada sodyum nitrat çözeltilerinin enjeksiyonuna dayanır. Ölçümler en azından iki kere yapılmalıdır.

1.8.3. Alıkonulma zamanlarının belirlenmesi tR

Referans maddeler bölüm 1.3 'de açıklandığı şekilde seçilmelidir. Bunlar karışım standardı halinde alıkonulma zamanlarını belirlemek için enjekte edilebilir. Ancak bunun için tek koşul bir standardın alıkonulma zamanının diğerinden etkilenmemesidir. Kalibrasyon düzenli zaman aralıklarında yapılmalıdır ve kolon performansının beklenmedik değişimlerini bertaraf etmek için en azından günde iki kere tekrar edilmelidir. En iyisi, alıkonma zamanlarının kaymadığını doğrulamak için kalibrasyon enjeksiyonları test maddesi enjeksiyonlarından önce ve sonra yapılmalıdır. Test maddeleri kolonun aşırı yüklenmesinin önüne geçmek için mümkün olduğu kadar az miktarda ama ayrı olarak enjekte edilir ve alıkonulma zamanları belirlenir. Ölçümün güvenirliğini artırmak için en azında iki ölçüm yapılmalıdır. Tekil ölçümlerden türetilen log Koc değerleri 0,25 log birimi aralığına düşmelidir.

1.8.4. Değerledirme

kapasite faktörü k' eşitlik 4'e göre seçilen referans maddelerinin ölü zamanı ve alıkonulma zamanlarından hesaplanır (bkz bölüm 1.2).

Referans maddelerin log k' değerleri kesikli denge deneylerinden elde edilen log Koc değerlerine karşı grafiğe geçirilir. Bu grafiği kullanarak bir test maddesinin log k' değerinden log Koc değeri hesaplanır. Eğer gerçek sonuçlar log Koc değerinin kalibrasyon aralığının dışında olduğunu gösterirse test daha uygun bir referans madde kullanılarak tekrarlanmalıdır.

2. VERİLER VE RAPORLAMA

Test raporu şağıdaki bilgileri içermelidir.

- testin ve referans maddeleri ve saflıklarının tanımı ve eğer gerekli ise pKa değerleri
- ekipmanın açıklması ve çalışma koşulları analitik kolonun tür ve boyutları, ölçüm yolları, hareketli faz (bileşenleri, oranı ve pH), ölçümler esnasındaki sıcaklık aralığı
- ölü zaman ve belirlenmesi için kullanılan yöntem
- test maddesinin büyüklükleri ve kolona verilen referans maddeler
- kalibrasyon için kullanılan maddelerin alıkonulma zamanları
- uygun regresyon doğrusunun ayrıntıları (log k' vs log Koc) ve regresyon doğrusunun grafiği
- ortalama alıkonulma zamanı ve test maddesi için hesaplanan log Koc değeri
- kromatogramlar

3. KAYNAKLAR

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (Koc) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 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, 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, 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 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), 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 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), 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, 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), 1373-1384.

Ek-I

Tablo 1

Toprak ve lağım çamurları için Koc değerlerinin karşılaştırılması ve HPLC izleme yöntemi ile hesaplanan değerleri

Madde	CAS-No.	log K_{oc} lağım çamuru	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} toprak	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazine	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
Fenthion	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
Phenanthrene	85-01-8	4.35	3.72	0.63	4.09	3.52	0.57
Benzoic acid phenylester	93-99-2	3.26	3.03	0.23	2.87	2.94	0.07
Benzamide	55-21-0	1.60	1.00	0.60	1.26	1.25	0.01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1.52	1.49	0.03	1.93	1.66	0.27
Acetanilide	103-84-4	1.52	1.53	0.01	1.26	1.69	0.08
Aniline	62-53-3	1.74	1.47	0.27	2.07	1.64	0.43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2.45	2.59	0.14	2.55	2.58	0.03

KAYNAKLAR

1 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), 121 - 128.

2 W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

Tablo 2

HPLC-yönteminin geçerliliğini test etmEk-Ve iyileştirmek için teste katılan laboratuarların
(11 laboratuvar katılımlı)
sonuçlarının kendi arasında karşılaştırılması

Madde	CAS-No.	log K_{oc} [OECD 106]	K_{oc} [HPLC yöntemi]	log K_{oc}
Atrazine	1912-24-9	1.81	78 ± 16	1.89
Monuron	150-68-5	1.99	100 ± 8	2.00
Triapenthenol	77608-88-3	2.37	292 ± 58	2.47
Linuron	330-55-2	2.59	465 ± 62	2.67
Fenthion	55-38-9	3.31	2062 ± 648	3.31

KAYNAKLAR

1 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), 121 - 128.

Tablo 3

HPLC izleme yöntemi için
toprak adsorpsiyon verilerine göre önerilen referans maddeler

Referans maddesi	CAS-No.	kesikli dengede ortalama log Koc değerleri	Koc verilerinin sayısı	log S.D.	Kaynak
Acetanilide	103-84-4	1.25	4	0.48	a
Phenol	108-95-2	1.32	4	0.70	a
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1.45	3	0.90	b
N.N-dimethylbenzamide	611-74-5	1.52	2	0.45	a
4-Methylbenzamide	619-55-6	1.78	3	1.76	a
Methylbenzoate	93-58-3	1.80	4	1.08	a
Atrazine	1912-24-9	1.81	3	1.08	c
Isoproturon	34123-59-6	1.86	5	1.53	c
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1.95	3	1.31	b
Aniline	62-53-3	2.07	4	1.73	a
3,5-Dinitrobenzamide	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
Triazoxide	72459-58-6	2.44	3	1.66	c
Triazophos	24017-47-8	2.55	3	1.78	c
Linuron	330-55-2	2.59	3	1.97	c
Naphthalene	91-20-3	2.75	4	2.20	a
Endosulfan-diol	2157-19-9	3.02	5	2.29	c
Methiocarb	2032-65-7	3.10	4	2.39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3.16	4	2.83	a
1,2,3-Trichlorobenzene	87-61-6	3.16	4	1.40	a
γ-HCH	58-89-9	3.23	5	2.94	a
Fenthion	55-38-9	3.31	3	2.49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3.43	4	2.68	a
Pyrazophos	13457-18-6	3.65	3	2.70	c
α-Endosulfan	959-98-8	4.09	5	3.74	c
Diclofop-methyl	51338-27-3	4.20	3	3.77	c
Phenanthrene	85-01-8	4.09	4	3.83	a
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4.89	4	4.46	a
DDT	50-29-3	5.63	1	-	b

KAYNAKLAR

/a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC.
UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
/b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
/c/ Data provided by industry.

C.20 DAPHNIA MAGNA ÜREME TESTİ

1. YÖNTEM

Bu üreme toksisitesi test yöntemi, OECD TG 211 (1998) yöntemi ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Testin ana amacı, kimyasalların *Daphnia magna* üremesinin verimliliği üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Ebeveyn hayvanlar: testin başlangıcında bulunan ve üreme verimliliği çalışmasının amacı olan dişi Daphnia' dır.

Yavrular (döl): test sürecinde ebeveyn hayvanlar tarafından üretilen genç *Daphnia* lar.

Olumsuz Etki Gözlemlenen En Düşük Konsantrasyon (LOEC): üreme ve ebeveyn hayvanların ölümleri ($p<0,05$' de) üzerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında belirtilen maruz kalma periyodu içinde istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu gözlenen test edilen en düşük madde derişimdir. Fakat LOEC' den yüksek tüm test derişimleri LOEC' te gözlenen zararlı etkilere eşit veya daha fazla olmalıdır. Bu iki koşul sağlanmadığında, LOEC' in (ve dolayısıyla NOEC) nasıl seçildiği ile ilgili tam bir açıklama verilmelidir.

Olumsuz Etki Gözlemlenmeyen Konsantrasyon (NOEC): kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirtilen maruz kalma süresi içinde, istatistiksel olarak belirgin bir etkinin ($p<0,05$) var olmadığı LOEC' in hemen altındaki test derişimidir.

EC_x: *Daphnia magna*' nın belirtilen maruz kalma süresi içerisinde üremesinde yüzde x azalmaya sebep olan su içinde çözünmüş test maddesi derişimidir.

İçsel (kendine özgü) artış oranı: üreme verimini ve yaşlanmaya özgü ölümü (20)(21)(22) birleştiren popülasyon büyümesinin bir ölçütüdür.

Gözlem sınırı:gözlemlenebilen fakat miktarı belirlenemeyen en düşük derişimdir.

Tayin sınırı: miktar olarak ölçülebilen en düşük derişimdir.

Ölüm oranı: bir hayvan hareketsizken ölü olarak kaydedilir, örneğin yüzemezken, veya test kabının hafifce çalkalanmasından sonra 15 saniye içinde ilave bir hareket gözlenmediği durumlarda (Farklı bir tanım kullanılıyorsa, referansı ile birlikte rapor edilmelidir).

1.3. Test yönteminin ilkesi

Testin başlangıcında 24 saatten daha az yaşlı olan genç dişi *Daphnia* (ebeveyn hayvanlar) suya eklenerek belirtilen derişim aralığında test maddesine maruz bırakılır. Test süresi 21 gündür. Test sonunda ebeveyn hayvan başına yaşayan üretilmiş yavruların toplam sayısı değerlendirilir. Bu yetişkinler vasıtasıyla üretilen ve test esnasında ölen gençlerin hesaplamalardan çıkarılması anlamına gelir. Ebeveyn hayvanların üreme verimi diğer

şekillerde ifade edilir (örneğin yavrunun gözlendiği ilk günden itibaren günde ebeveyn hayvan başına üretilen yaşayan yavru sayısı olarak) fakat ek olarak bunlar test sonunda yaşayan ebeveyn başına üretilen geçlerin toplam sayısı olarak rapor edilmelidir. Test maddesine maruz kalan hayvanların üreme verimi olumsuz etkinin gözlemlendiği en düşük konsantrasyon (LOEC) ve bundan dolayı olumsuz etkinin gözlemlenmediği konsantrasyonu (NOEC) belirlemek için kontrol veya kontrollerle karşılaştırılmalıdır. Ayrıca ve mümkün oldukça üreme veriminde % x azalmaya sebep olan derişimin hesaplanması için veriler regresyon modeli kullanılarak analiz edilir. (örneğin EC_{50}, EC_{20} veya EC_{10}).

Ebeveyn hayvanların hayatta kalması ve birinci kuluçka üretim zamanı da rapor edilmelidir. Maddelerin büyüme (örneğin uzunluk) gibi parametreler üzerindeki diğer etkileri ve olası kendine özgü artış oranı da incelenebilir.

1.4. Test maddesi ile ilgili bilgi

Daphnia magna ile yürütülen Akut Toksisite testinin sonuçları (bakınız Yöntem C.2, Bölüm I) mevcut olmalıdır. Bu sonuçlar üreme testlerinde uygun test derişimi aralıklarının seçimi için faydalı olabilir. Test maddesinin suda çözünürlüğü ve buhar basıncı bilinmeli ve test çözeltisi içindeki test maddesinin miktar tayini için geri kazanım verimliliği ve tayin sınırı ile rapor edilmiş anlamlı bir analitik yönteminin mevcut olması gerekir.

Yapısal formül, maddenin saflığı, ışıktaki kararlılığı, test koşulları altında kararlılığı, pK_a, P_{ow} ve kolay biyolojik bozunabilirlik için yapılmış test (Bakınız yöntem C.4) sonuçları gibi test maddesi hakkında bilgiler test koşullarının oluşturulmasında faydalı olabilir.

1.5. Testin geçerliliği

Testin geçerli olabilmesi için kontrol ve kontrollerde aşağıdaki yapılabilirlilik ölçütlerinin sağlanması gerekir:
- ebeveyn hayvanların ölümü (mortalitesi) (dişi *Daphnia*) test sonunda % 20'yi geçemez;
- hayatta kalan ebeveyn hayvan başına üretilmiş hayatta olan yavruların ortalama sayısı test sonunda $\geq$60 dır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Düzenek

Test maddesi ile temas halinde olacak test kapları ve diğer cihazlar tamamen cam veya kimyasal olarak reaksiyona girmeyen malzemeden yapılmış olmalıdır. Test kapları normal olarak cam beherler olacaktır.
Ek olarak, aşağıdaki gereçlerin bazıları veya tamamı gereklidir;

- oksijen metre (düşük hacimli örneklerde çözünmüş oksijen miktarını ölçmek için mikroelektrot ile ve diğer uygun donanıma sahip);
- sıcaklık kontrolu için yeterli cihazlar;
- pH metre;
- su sertliğinin belirlenmesi için donanım;
- suyun toplam organik karbon (TOC) miktarının belirlenmesi için donanım veya kimyasal oksijen ihtiyacının (COD) belirlenmesi için donanım;
- ışıklandırma yönetiminin kontrolu ve ışık şiddetinin ölçümü için yeterli cihazlar;

1.6.2. Test Organizması

Testte kullanılacak tür *Daphnia magna* Straus' dur. Geçerlilik ölçütleri sağlayan diğer *Daphnia* türlerinin kullanımı da uygundur (*Daphnia* türleri için geçerlilik ölçütleri kontrollerdeki üreme verimi ile ilgilidir). Eğer diğer *Daphnia* türleri kullanılıyorsa bunlar açıkça tanımlanmalı ve kullanımın haklı gerekçeleri açıkça belirtilmelidir.

Tercihen, klon genetik kopyası (genotyping) ile tanımlanmalıdır. Araştırma (1) Klon A'nın (Fransada IRCHA kaynaklı) (3) üreme performansını yöntemde açıklanan koşullar altında kültürlendiğinde hayatta kalan her ebeveyn başına ≥60 yavru kalite ölçütünü sürekli olarak sağladığını göstermektedir. Fakat, *Daphnia* kültürlerinin testin geçerlilik ölçütlerini sağladığı gösterilen diğer klonlarda kabul edilebilirdir.

Test başlangıcında, hayvanlar 24 saatten daha az yaşlı olmalı ve ilk yavru soyundan olmamalıdır. Sağlıklı stoklardan türetilmiş olmalıdır (örneğin yüksek ölüm oranı, erkeklerin baskınlığı ve ephippia, ilk yavrunun üretilmesinde gecikme, renksiz hayvanlar, vs. gibi stres işaretleri göstermeyen). Stok hayvanları test kullanılacak koşullara benzer kültür koşullarında korunmalıdır (ışık, sıcaklık, ortam, birim hacim başına besleme ve hayvan). Eğer testte kullanılacak *Daphnia* kültür ortamı rutin olarak kullanılan *Daphnia* kültüründen farklı ise, normal olarak 3 haftalık bir test öncesi alıştırma periyodu dahil etmek ebeveyn hayvanların strese girmesini engellemek için iyi bir alıştırma olacaktır.

1.6.3. Test Ortamı

Tamamıyla tanımlanmış bir ortamın testte kullanılması gerekmektedir. Karakterize etmenin zor olduğu katkıların (örneğin deniz yosunu, toprak ekstraktı vs.) kullanımını engelleyebilir, ve böylece laboratuarlar arası standardlaştırma imkanlarını da artırabilir.
Elendt M4 (4) ve M7 ortamı (Bakınız Ek 1) bu amaç için uygun bulunmuştur. Bununla birlikte, diğer ortamlar (örneğin (5)(6)) *Daphnia* kültürlerin testinin geçerlilik ölçütlerini yerine getirme performansını sağlayanlar da uygundur.

Tanımlanmamış katkılar içeren ortam kullanılırsa, bu katkılar açıkça belirlenmeli ve bileşim hakkındaki test raporunda gerekli bilgiler, özellikle karbon içeriğini dikkate alarak sağlanmalıdır. Organik katkının stok'unun Toplam Organik Karbon (TOC) ve/veya Kimyasal Oksijen İhtiyacı (COD) belirlenmesi gereklidir ve sonuç olarak test ortamı içindeki TOC/COD' a yapılan katkının hesabı yapılır. Ortam (örneğin deniz yosunu (Algae) eklemeden öce) içindeki TOC düzeyleri 2 mg/l altında olması zorunluluğu vardır.

Metal içeren test maddelerini test ederken, test ortamının test maddesinin toksisitesini artırabilecek özelliklerinin (örneğin sertlik, şelatlaşma kapasitesi) farkına varmak önemlidir. Bu sebeple tamamen tanımlanmış ortam arzu edilir. Fakat, şu anda, uygun uzun vadeli *Daphnia magna* kültürü olarak bilinen ortamlar sadece Elendt M4 ve M7 dir. Her iki ortamda şelatlaştırıcı ajan EDTA içerir. EDTA içermeyen M4 ve M7 ortamlarında üreme testi gerçekleştirildiğinde, çalışma (2) kadmiyumun "görünür toksisitesinin" genel olarak daha az olduğunu göstermektedir. Bu yüzden M4 ve M7 metal içeren test maddeleri için zorunlu değildir, ve bilinen şelatlaştırıcı ajanlar içeren diğer ortamların kullanımından da kaçınmak gerekir. Metal içeren maddeler için EDTA içermeyen, yosun ekstraktı (8) eklenmiş ASTM tarafından belirtilen yeniden oluşturulmuş sert tatlı su (7) gibi alternatif ortamların kullanılması tavsiye edilebilir. ASTM tarafından belirtilen yeniden oluşturulmuş sert tatlı

suyun bu bileşimi ve yosun ekstraktı, eklenen yosun ekstraktı içindeki organik karbon içeriği yüzünden hala yumuşak şelatlaştırma etkisi göstermesine rağmen, uzun vadeli kültür ve *Daphnia magna* testi (2) için uygundur.

Testin başlangıcında ve test esnasında, çözünmüş oksijen derişimi 3 mg/l'nin üzerinde olmalıdır. pH 6-9 aralığında olmalı ve normal olarak herhangi bir testte 1,5 birimden fazla değişmemelidir. 140 mg/l üzerindeki sertlik ($CaCO_3$ olarak) zorunludur. Bu seviye ve üzerindeki testler geçerlilik ölçütleriyle (9)(10) uyum içinde üreme performansı gösterir.

1.6.4. Test çözeltileri

Çoğunlukla stok çözeltilerin seyreltilmesiyle seçilen derişimlerdeki çözeltiler hazırlanır. Stok çözeltiler tercihen test maddesi ortamı içerisinde çözülerek hazırlanır.
Organik çözücülerin ve dağıtıcıların kullanımı uygun derişimde stok çözelti hazırlamak için bazı durumlarda gerekli olabilir, fakat bu tip maddelerin kullanımından kaçınmak için her türlü caba gösterilmelidir. Uygun çözcülere örnek olarak aseton, etanol, dimetilformamid ve trietilenglikol gösterilebilir. Uygun dağıtıcılara örnek olarak Cremophor RH4, metilselüloz %0,01 ve HCO-40 gösterilebilir. Hiçbir durumda, çözelti içindeki test maddesi test ortamı içerisindeki çözünürlük sınırını aşmamalıdır.
Çözücüler Su içinde doğru olarak dozlanabilen stok çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılır. En son test ortamı içerisindeki gerekli çözücü derişiminde (örneğin ≤0,1 ml/l), yukarıda listelenen çözücüler toksik olmayacak ve maddenin suda çözünürlüğünü artırmayacaktır.
Dağıtıcılar doğru dozlama ve dağılıma yardımcı olabilirler. En son test ortamı içerisindeki gerekli çözücü derişiminde (örneğin ≤0,1 ml/l), yukarıda listelenen dağıtıcılar toksik olmayacak ve maddenin suda çözünürlüğünü artırmayacaktır.

1.7. Testin dizaynı

İşlemler test kaplarına dağıtılmalı ve test kabının takip eden tüm işlemleri rastlantısal olacak şekilde yapılmalıdır. Bunu yaparken ortaya çıkan başarısızlıklar derişim etkisi olarak yorumlanabilen yanılgıyla sonuçlanabilir. Özellikle, deneysel birimler işlem veya derişim sırasına göre yürütülüyorsa, o zaman bazen işlemci yorgunluğu veya diğer hatalar gibi zamanla ilgili etkiler, yüksek derişimlerde daha büyük etkilere neden olabilir. Ayrıca, eğer test sonuçları testin ilk ve çevresel koşullarından etkilenme eğilimindeyse, mesela laboratuvardaki pozisyonu gibi, testin durdurulması göz önünde bulundurulmalıdır.

1.8. İşlem

1.8.1. Maruz kalma koşulları

1.8.1.1. Süre

Test süresi 21 gündür.

1.8.1.2. Yükleme

Ebeveyn hayvanlar her test kabında bir tane olacak şekilde, her test kabı içinde 50-100 ml ortam ile tek tek korunmalıdır.

Kimyasal analiz için kullanılan tekrarların toplanmasına izin verilebilir olsa da, test maddesi derişimini belirlemek için kullanılan analitik işlemin gerekliliklerini karşılamak, için bazen daha büyük hacimler gerekebilir. 100 ml'den daha büyük hacimler kullanılıyorsa, Daphnia' ya verilen yiyecek payı, yeterli besinin varlığından emin olmak ve kalite ölçütlerine uygunluk için artırılması gerekebilir. Akış yollu testler için, teknik sebeplerden dolayı alternatif dizaynlar dikkate alınabilir (örneğin daha geniş hacimdeki 10 hayvanlık dört grup), fakat test dizaynındaki en küçük değişiklik rapor edilmelidir.

1.8.1.3. Hayvan sayıları

Yarı statik testler için, her test derişiminde ve kontrol serilerinde en az 10 hayvan bireysel olarak bulunmalıdır.

Akış yollu testler için, her test derişiminde 10'lu gruplar halinde dörde bölünmüş 40 hayvanın uygun olduğu gösterilmektedir (1). Daha düşük sayılardaki bir test organizması için derişim başına eşit sayıda hayvan (örneğin her biri için 4 tekrar ile beş daphnid) ile iki veya daha fazla tekrarlar halinde en az 20 hayvan kullanılması zorunludur. Testlerde hayvanların gruplar halinde tutulmasına dikkat edilmelidir, eğer ebeveyn hayvanlar ölürse, test sonunda ebeveyn hayvan başına üretilen yaşayan yavru toplam sayısı olarak üreme veriminin ifade edilmesi mümkün olmayacaktır. Böyle durumlarda üreme verimi, "test başında varolan ebeveyn sayısı başına üretilmiş yaşayan yavruların toplam sayısı" olarak ifade edilebilir.

1.8.1.4. Besleme

Yarı statik testler için besleme tercihen günlük olarak yapılmalı, değilse haftada en az üç kere (örneğin ortam değişikliklerine uygun olarak) yapılmalıdır. Bu durumdan sapmalar (örneğin akış yollu testlerde) rapor edilmelidir.
Test esnasında ebeveyn hayvanların diyeti, tercihen aşağıdakilerden biri veya birkaçının yaşayan deniz yosunu hücreleri olmalıdır: Chlorella sp, Selenastrum capricornutum (şimdi Pseudokirchneriella subcapitat (11)) ve Scenedesmus subspicatus. İhtiyacı karşılayacak diyet her ebeveyn hayvana sağlanan organik karbon (C) miktarı esasına göre olmalıdır. Bir araştırma *Daphnia magna* için 0,1 ve 0,2 mg C/*Daphnia*/gün arasındaki günlük yiyecek istihkakının test ölçütlerini sağlamak için gerekli olan yavru sayısına ulaşmak için yeterli olduğunu göstermektedir. Test periyodu boyunca yiyecek miktarları hem istikrarlı bir oranda sağlanabilir hem de daha sonra arzu edildiğinde başlangıçta veya test esnasında ebeveyn hayvanların büyümesi dikkate alındığında artırılacak şekilde daha düşük oranlarda da sağlanabilir. Bu durumda, günlük verilen yiyecek istihkakı, gerekli olan 0,1 – 0,2 mg C/*Daphnia*/gün aralığında kalmaya devam etmelidir.

Gerekli olan günlük yem seviyesinde (örneğin karbon içeriği ölçümünün zaman alıcı olmasından dolayı kolaylık sağlamak için) besleme yapmak için deniz yosunu hücresi sayısı veya ışık ölçümü gibi ikame ölçümler kullanılacaksa, her laboratuar denizyosunu kültüründeki karbon miktarının ikame ölçümü ile ilgili kendi sayısal bağıntıları gösteren çizelgesini (nomograph) hazırlamalıdır (Bakınız EK-II nomograf (sayısal bağıntıları gösteren çizelge) hazırlanması için). Nomograflar en az yıllık olarak ve deniz yosunu kültür koşulları değiştikçe kontrol edilmelidir. Işık absorbansının karbon miktarı için hücre sayısına göre daha iyi bir vasi ölçüm olduğu bulunmuştur (13).

Test kaplarına transfer edilen deniz yosunu kültür ortamı hacmini en az indirmek için *Daphnia* derişik deniz yosunu süspansiyonu ile beslenmelidir. Deniz yosunu derişimine,

santrifüjü takiben saf su içinde, iyonu giderilmiş su içinde veya *Daphnia* kültür ortamında yeniden yapılan süspansiyon ile ulaşılır.

1.8.1.5. Işık

15-20 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ değerini geçmeyen ışık şiddetinde 16 saatlik ışık.

1.8.1.6. Sıcaklık

Test ortamının sıcaklığı 18-22 °C aralığında olmalıdır. Fakat mümkünse hiçbir testte sıcaklık belirtilen sınırlarda 2 °C' tan daha fazla değişmez (örneğin 18-20, 19-21 veya 20-22 °C). Sıcaklığın izlenmesi amacıyla, ek test kaplarının kullanılması uygun olabilir.

1.8.1.7. Havalandırma

Test esnasında test kapları havalandırılmamalıdır.

1.8.2. Test derişimi

Normal olarak, 3,2'yi geçmeyen ayırma faktörü ile geometrik seriler halinde düzenlenmiş en az beş test derişimi olmalıdır ve her test derişimi için uygun sayıda tekrarlar kullanılmalıdır (Bakınız bölüm 1.8.1.3). Eğer beş derşimden daha az derişim kullanılırsa haklı gerekçeler belirtilmelidir. Maddeler test ortamında çözünürlük sınırlarının üzerinde test edilmemelidir.

Derişim aralığını ayarlarken aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir:

i. Eğer amaç LOEC/NOEC'i elde etmek ise, en düşük test konsantrasyonu yeterince düşük olmalıdır, şöyleki, o konsantrasyondaki doğurganlık kontrolden belirgin olarak daha azdır. Eğer bu böyle değil ise test azaltılmış en düşük konsantrasyonla tekrarlanmalıdır.

ii. Eğer amaç LOEC/NOEC'i elde etmek ise, en yüksek test konsantrasyonu yeterince yüksek olmalıdır, şöyleki, o konsantrasyondaki doğurganlık kontrolden belirgin olarak daha azdır. Eğer bu böyle değil ise test artırılmış en yüksek konsantrasyonla tekrarlanmalıdır.

iii. Üreme üzerindeki etkiler için EC_x değeri hesaplanırken, uygun güvenirlik seviyesi ile EC_x değerlerini tanımlamak için yeterli derişimlerin kullanılması tavsiye edilir. Üreme üzerindeki etkiler için EC_{50} değeri hesaplanırken, en yüksek test derişiminin EC50 değerinden büyük olması tavsiye edilir. Aksi takdirde, EC50' yi hesaplamak mümkün olmasına rağmen, EC50 için güvenirlik aralığı çok geniş olacaktır ve uygun modelin yeterliliğinin tatmin edici şekilde değerlendirilmesi mümkün olamayacaktır.

iv. Test derişim aralığı, tercihen yetişkinlerin hayatta kalması üzerinde belirgin bir etkisi olan herhangi bir derişimi içermemelidir. Çünkü bu test derişiminin doğasını üreme testinden, daha kompleks istatistiksel analizler gerektiren birleştirilmiş üreme ve ölüm oranı testine dönüştürecektir.

Test maddesinin toksisitesi ile ilgili daha önceki bilgiler (örneğin akut testinden ve/veya aralık bulma çalışmalarından) uygun test derişimlerinin seçilmesinde yardımcı olabilir.

Test çözeltilerinin hazırlanmasında yardımcı olarak bir çözücü veya dağıtıcı (dipersant) kullanıldığında (Bakınız bölüm 1.6.4), test kabındaki son derişim 0,1 ml/l' den daha fazla olmamalı ve tüm test kaplarında aynı olmalıdır.

1.8.3. Kontroller

Bir test ortamı kontrol serisi ve hatta, eğer anlamlı ise, çözücü ve dağıtıcı içeren bir kontrol serisi, test serisine ek olarak yürütülebilir. Bu yapıldığında çözücü ve dağıtıcı derişimi test maddesini içeren test kaplarınınkiyle aynı olmalıdır. Uygun sayıda denek kullanılarak tekrar yapılmalıdır. (Bakınız bölüm 1.8.1.3).
Genel olarak, iyi yürüyen bir sistemde, kontrol(ler) içindeki ebeveyn hayvan başına üretilen yaşayan yavru ortalama sayısı civarındaki değişme katsayısı ≤%25 olmalı ve bireysel olarak ele alınan hayvanların kullanıldığı test dizaynı için bu rapor edilmelidir.

1.8.4. Test ortamının yenilenmesi

Test ortamının yenilenme sıklığı, test maddesinin kararlılığına bağlıdır, fakat yenileme haftada en az üç kere yapılmalıdır. Eğer, ilk kararlılık testlerinden (Bakınız bölüm 1.4) maksimum yenileme periyodu boyunca (örneğin 3gün) test maddesi derişimi kararlı değilse (örneğin tanımlanan %80 – 120 aralığının dışında kalması veya ölçülen ilk derişimin %80' nin altına düşmesi) daha sık ortam yenilemesi veya akış yollu test kullanılması düşünülmelidir.

Yarı statik testlerde ortam yenilendiği zaman, test kaplarının ikinci bir serisi hazırlanır ve ebeveyn hayvanlar uygun çaptaki cam bir pipet yardımıyla bunlara transfer edilir. *Daphnia* ile transfer edilen ortam hacmi minimuma indirilmelidir.

1.8.5. Gözlemler

Test sırasında yapılan gözlemlerin sonuçları veri kağıtlarına kaydedilmelidir (Bakınız Ek-III Ek-III ve IV' teki örnekler). Eğer başka ölçümler gerekliyse (Bakınız 1.3 ve 1.8.8) ek gözlemlere ihtiyaç duyulabilir.

1.8.6. Yavrular

Her ebeveyn hayvandan üretilen yavrular, yetişkinler için verilen besinleri tüketmelerini engellemek için tercihen ilk yavruların görülmesinden itibaren ayrılmalı ve günlük olarak sayılmalıdır. Bu yöntemin amacı ile ilgili olarak sadece yaşayan yavruların sayılmasına gerEk-Vardır, fakat başarısızlıkla sonuçlanmış yumurtaların veya ölü yavruların varlığında bunlarda kaydedilmelidir.

1.8.7. Ölüm oranı

Ebeveyn hayvanlara ait olan ölüm oranı yavruların sayıldığı zamanla aynı zamanda tercihen günlük olarak kaydedilmelidir.

1.8.8. Diğer değişkenler

Bu yöntem prensip olarak üreme üzerindeki etkileri değerlendirmek için dizayn edilmiş olsa da, miktarları istatistiksel analize imkan verecek biçimde yeterince belirlenmiş diğer etkiler

için de kullanılabilir. Büyüme ölçümleri şiddetle arzu edilir, çünkü yanlız üreme ölçümünden daha kullanışlı olabilen öldürücü yan etkiler hakkında da bilgi sağlayan bir ölçümdür; test sonunda ebeveyn hayvanların uzunluklarının ölçümü (örneğin anal omurgayı hariç tutarak vücut uzunluğu) zorunludur. ölçülebilen ve hesaplanabilen diğer parametreler, ilk yavrunun üretimi için geçen zamanı (ve müteakip yavrular), hayvan başına düşen yavruların sayısı ve boyutu, iptal edilen yavruların sayısı, erkeklerin veya ephippia varlığı ve içsel nüfus artış hızı.

1.8.9. Analitik tayinlerin ve ölçümlerin sıklığı

Oksijen derişimi, sıcaklık, sertlik ve pH değerleri, taze ve eski ortamda, kontrol veya kontroller içinde ve en yüksek test derişimi içinde, en az haftada bir ölçülmelidir.

Test süresince, düzenli aralıklarla test maddesinin derişimi tayin edilmelidir.

Yarı statik testlerde, test maddesi derişimi, tanımlanmış derişimin (örneğin %80 – 120 aralığı içinde – Bakınız 1.4 ve 1.8.4) ± % 20' si içinde kalması beklenir. Taze olarak hazırlandığında ve testin ilk haftası içinde (örneğin taze olarak hazırlandığında ve yenileme esnasında aynı çözeltiden alınan örnekler analiz yapılmalıdır) üzerinde bir vesile ile yenileme işleminin gerçekleştiği bir zamanda en yüksEk-Ve en düşük test derişimlerinin analiz edilmesi zorunludur. Daha sonra bu tayinler en az haftalık aralıklarla tekrar edilmelidir.

Tanımlanan derişimin ±%20' si içinde kalması beklenmeyen test maddesi derişimlerinin testleri için, taze olarak hazırlandığında ve yenileme zamanlarında bütün test derişimlerinin analizi gereklidir. Her ne kadar bu testler için, test maddesinin ölçülen ilk derişimi tanımlanmış derişimin ±%20' si içinde bulunmadığında fakat ilk derişimin tekrarlanabilir ve kararlı olduğunu göstermek için yeterli delil sağlanabildiğinde, kimyasal tayinler 2 ve 3 hafta içinde en yüksEk-Ve en düşük test derişim tayinlerine indirgenebilir. Tüm durumlarda, test maddesi derişim tayininin yenileme öncesinde, sadece her test derişiminde bir tekrar kabında gerçekleştirilmesine gerEk-Vardır.

Eğer bir akış yollu test kullanılıyorsa, yarı statik testler için açıklanan benzer örnekleme yönetiminin kullanımı uygundur (fakat eski çözeltilerin ölçümü bu durumda kabul edilemez). Fakat test derişimlerinin kararlı olarak kaldığında emin olmak için, ilk hafta içinde örnekleme zamanı sayıların artırılması tavsiye edilebilir. Bu tiplerdeki testler içinde, seyrelticinin ve test maddesinin akış hızı günlük olarak kontrol edilmelidir.

Test boyunca, test edilen madde derişiminin tanımlanan veya ölçülen ilk derişimin %±20' si içinde tatmin edici derecede korunduğunu gösteren deliller varsa, o zaman sonuçlar tanımlanan ve ölçülen ilk değerler üzerine dayandırılabilir. Eğer tanımlanan ve ölçülen ilk derişimden sapma %±20' den daha büyükse, sonuçlar zaman ağırlıklı ortalama şeklinde ifade edilmelidir (Bakınız Ek-V).

2. VERİLER VE RAPORLAMA

2.1. Sonuçların işlenmesi

Bu testin amacı, test maddesinin yaşayan ebeveyn hayvan başına üretilen toplam canlı yavru sayısı üzerindeki etkisini belirlemektir. Ebeveyn hayvan başına toplam yavru sayısı her test

kabı (tekrar) için hesaplanmalıdır. Eğer herhangi bir test kabında test esnasında ebeveyn hayvan ölürse veya erkeğe dönüşürse, o zaman bu tekrar analiz dışında tutulur. Daha sonra analizde azaltılmış sayıdaki tekrarlar esas alınır.
Kimyasalların üreme verimi üzerindeki etkileri için LOEC ve dolayısıyla NOEC' in hesaplanmasında her derişim için ve toplanmış artık standard sapma için tekrarlara karşı ortalama üreme veriminin hesaplanması gereklidir, bu varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılabilir. Daha sonra her derişim için ortalama uygun çoklu karşılaştırma metodu kullanılarak kontrol ortalaması ile karşılaştırılmalıdır. Dunnett veya Williams testleri kullanışlı olabilir (14)(15)(16)(17). Varyans'ın homojenliğinin ANOVA varsayımının geçerli olup olmadığı kontrol etmek gereklidir. Bunun biçimsel değer testi yerine grafiksel olarak yapılması zorunludur (18); uygun bir alternatifte Barlett testini uygulamaktır. eğer varsayım geçerli değilse, o zaman ANOVA veya ağırlıklandırılmış ANOVA gerçekleştirmeden önce verileri homojenleştirilmiş varyans haline dönüştürmesine önem verilmelidir. Algılanabilir etkinin boyutu ANOVA (örneğin en az belirgin fark) kullanarak hesaplanabilir ve rapor edilebilir.

Üreme veriminde % 50 azalmaya sebep olacak olan derişimin hesaplanması için (örneğin EC_{50}), lojistik eğri gibi uygun bir eğri en küçük kareler yöntemi gibi istatistiksel metotlar kullanılarak verilere uydurulmalıdır. Eğri parametrelerle ifade edilen bir hale getirilebilir, bu sayede EC_{50} ve onun standart hatası doğrudan hesaplanabilir. Bu EC_{50} ile ilgili güven sınırlarının hesaplanmasını büyük oranda kolaylaştırır. Farklı güvenlik seviyelerinin tercih edilmesi için iyi sebepler bulunmadıkça, iki taraflı % 95 güven sınırları kullanılmalıdır. Uydurma işlemi, tercihen uyum eksikliği belirtisi değerlendirmesi için bir anlam sağlar. Bu grafiksel olarak yapılabilir veya karelerin kalıntı toplamlarının 'uyum eksikliği' ve 'saf hata bileşenleri' halinde bölünmesiyle ve uyum eksikliği için bir belirginlik testinin gerçekleştirilmesi ile yapılabilir. Çünkü, üretilen gençlerde yüksek doğurganlık sağlayan işlemler, daha düşük doğurganlık sağlayan işlemlerden, daha büyük varyans'a sahip olma eğilimindedirler. Farklı işlem gruplarında gözlenen değerlerin ağırlıklandırılmasında, farklı varyansları yansıtmak için dikkat gösterilmelidir (Geriye kalan bilgi için bakınız kaynak 18).

Son halka testinden elde edilen verilerin analizinde (2), diğer uygun modeller kullanılabilir durumdayken aşağıdaki model kullanılarak lojistik eğri oluşturulmuştur.

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

Y: Test sonunda canlı ebeveyn hayvan başına gençlerin toplam sayısı (her kap için hesaplanmış)
x: madde derişimi
c: x = 0 olduğunda gençlerin tahmini sayısı
x_0: popülasyondaki EC_{50}
b: eğim parametresi

Bu model farklı durumlar için yeterli görülmektedir, fakat bu modelin uygun olmayacağı testlerde olacaktır. Yukarıda önerilen modelin geçerliliği için kontrol yapılmalıdır. Bazı durumlarda, düşük derişimlerde geliştirilmiş etki yaratan hormesis modelinin kullanılması uygun olabilir (19).

Diğer etki derişimleri,EC_{50} hesaplamasında kullanılan modelin farklı parametreler halinde ifade edilerek kullanılması tercih edilmesine rağmen örneğin EC_{10} veya EC_{20} değerleri de hesaplanabilir.

2.2. Test raporu

Test raporu aşağıdakileri içermelidir.

2.2.1. Test maddesi:

- Fiziksel doğası ve ilgili fizikokimyasal özellikler;
- saflığı da içeren kimyasal tanımlama verileri;

2.2.2. Test türleri :

- klon (genetik olarak yazılı olsa da) , tedarikçi veya kaynak (biliniyorsa) vekültür koşulları kullanılır.Daphnia magna'dan farklı bir tür kullanılırsa, bu durum raporlanmalı ve gerekçelendirilmelidir.

2.2.3. Test koşulları

- kullanılan işlem (örneğin; yarı statik veya akış yollu, hacim, litre başına yüklenen *Daphnia* sayısı);
- ışığa maruz kalma zamanı ve ışık şiddeti;
- test dizaynı (örneğin; tekrar sayıları, tekrar başına ebeveyn sayısı);
- kullanılan kültür ortamının detayları;
- eğer kullanılıyorsa, eklenen organik madde ve kompozisyonu, kaynağı, hazırlama yöntemi, stokların TOC/COD değerleri, test ortamında sonuçlanan TOC/COD' un hesaplaması;
- miktarı (mg C/*Daphnia*/gün şeklinde), besleme planını (örneğin; yiyecek tiplerini, deniz yosununun spesifik ismini ve eğer biliniyorsa, ırk ve kültür koşulları), içeren, besleme ile ilgili ayrıntılı bilgi;
- stok çözeltilerini hazırlamada kullanılan yöntem ve yenileme sıklığı (eğer kullanılıyorlarsa, çözücü ve dağıtıcı ve derişimleri verilmelidir).

2.2.4. Sonuçlar

- test maddesinin kararlığı ile ilgili herhangi bir ön çalışmanın sonuçları;
- tanımlanan test derişimi ve test kapları içindeki test maddesinin derişimini belirlemek için yapılan tüm analizlerin sonuçları (Bakınız EK-IV içindeki örnEk-Veri kağıtları); yöntemin geri kazanım etkinliği ve tayin sınırı da rapor edilmelidir.
- test kapları içerisindeki su kalitesi (örneğin pH, sıcaklık ve çözünmüş oksijen derişimi TOC ve/veya COD ve gerekli olduğunda sertlik) (EK-III' teki örnEk-Veri kağıdına bakınız);
- her ebeveyn hayvan tarafından yaşatılan canlı yavruların tam kaydı (EK-III, EK-III' teki örnEk-Veri kağıdına bakınız);
- ebeveyn hayvanlara ait ölü sayıları ve ölümün gerçekleştiği gün (EK-III, EK-III' teki örnEk-Veri kağıdına bakınız);

- kontrol doğurganlığı için varyasyon katsayısı (test sonundaki canlı ebeveyn hayvan başına toplam canlı yavru sayısı esasına göre);
- test sonundaki ebeveyn hayvan başına toplam canlı yavru ağırlığına (gram) karşı gelen test maddesi derişiminin grafiği;
- üreme için en düşük etki gözlenen derişim (LOEC) uygulanan istatistiksel prosedürlerin açıklaması ile birlikte ve hangi boyuttaki etkilerin algılanabileceğinin belirtileri ve üreme için etki gözlenmeyen derişim (NOEC); uygun olduğunda, ebeveyn hayvanların ölüm oranları için LOEC/NOEC de rapor edilmelidir.
- uygun olduğunda, üreme ve güven aralıkları için ECx ve hesaplaması için kullanılan bir uydurulmuş model grafiği, doz-tepki eğrisinin eğimi ve onu standart hatası;
- gözlenen diğer biyolojik etkiler veya ölçümler: diğer herhangi bir biyolojik etki gözlendiğinde ve ölçüldüğünde (örneğin ebeveyn hayvanların büyümesi) haklı gerekçeleri de içerecek şekilde rapor edin;
- test yönteminden herhangi bir sapmanın açıklaması.

3. KAYNAKLAR

(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, 257 -265.

(4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 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, 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrat es and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(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.) pp 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, 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), 185 -196.

(11) Korshikov (1990). Pseudokirchneriella subcapitata Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard Daphnia juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.
(14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
(15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
(16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
(17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 510-531.
(18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, 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, 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. Mc Graw 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, 1156-1166.

Ek-I

Tamamen tanımlanmış Elendt m7 ve m4 ortamlarının hazırlanması

Elendt M7 ve M4 ortamlarına alıştırma

Bazı laboratuvarlar su piresinin M4 (1) ve M7 ortamına doğrudan transferinin zorluğu konusunda tecrübelidirler. Fakat, dereceli alıştırma ile bazı başarılar elde edilir, örneğin sahip olunan ortamı %30' luk Elendt ortamına hareket ettirerek, daha sonra % 60 Elendt ve daha sonra %100 Elendt ortamına hareket ettirerek. Alıştırma periyodunun bir ay boyunca devam ettirilmesi gerekebilir.

Hazırlama

Eser elementler

İlk önce her eser elementin uygun saflıkta su içinde kendi stok çözeltileri (I) hazırlanır, örneğin iyonu giderilmiş, damıtılmış ve ters ozmoz yapılmış su ile. Bu stok çözeltilerinden (I) bütün eser elementleri içeren ikinci bir stok çözeltiler hazırlanır (II) (birleştirilmiş çözelti), örnek olarak:

Stok çözeltiler I (tek madde)	**Suya eklenen miktar mg/l**	**Derişim (M4 ortamına bağlı olarak) kat**	**Birleşik stok çözelti II' yi hazırlamak için aşağıdaki miktarları stok çözelti I'den suya ekleyin ml/l**	
			M4	**M7**
H_3BO_3	57 190	20.000	1,00	0,25
$MnCl_2$ *4 H_2O	7 210	20.000	1,00	0,25
LiCl	6 120	20.000	1,00	0,25
RbCl	1 420	20.000	1,00	0,25
$SrCl_2$ *6 H_2O	3 040	20.000	1,00	0,25
NaBr	320	20.000	1,00	0,25
Na_2MoO_4*2H_2O	1 260	20.000	1,00	0,25
$CuCl_2$ * 2H_2O	335	20.000	1,00	0,25
$ZnCl_2$	260	20.000	1,00	1,00
$CoCl_2$ * 6 H_2O	200	20.000	1,00	1,00
KI	65	20.000	1,00	1,00
Na_2SeO_3	43.8	20.000	1,00	1,00
NH_4VO_3	11.5	20.000	1,00	1,00
Na_2EDTA*2 H_2O	5000	2.000	-	-
$FeSO_4$* 7 H_2O	1 991	2.000	-	-
Na_2EDTA veya $FeSO_4$ çözeltileri teker teker hazırlanır, beraber dökülür ve hemen otoklavlama yapılır. Bu aşağıdakini verir				
2 litre Fe-EDTA çözeltisi		1000-kat	20.0	5.0

M4 ve M7 ortamı

M4 ve M7 ortamı stok çözelti II kullanarak hazırlanır, makro-besinler ve vitaminler aşağıdaki gibidir:

	Suya eklenen miktar mg/l	Derişim (M4 ortamına bağlı olarak) kat	Ortamı hazırlamak için eklenen stok çözelti miktarı ml/l	
			M4	M7
Stok çözelti II birleştirilmiş eser elementler		20	50	50
Makro-besin stok çözeltisi (tek madde)				
$CaCl_2 * 2 H_2O$	293 800	1 000	1.0	1.0
$MgSO_4 * 7 H_2O$	246 600	2000	0.5	0.5
KCl	58 000	10 000	0.1	0.1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1.0	1.0
$Na_2SiO_3 * 9 H_2O$	50 000	5000	0.2	0.2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0.1	0.1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0.1	0.1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0.1	0.1
Birleştirilmiş Vitamin stok'u	–	10 000	0.1	0.1
Birleştirilmiş Vitamin çözeltisi, aşağıda gösterildiği gibi 3 vitamin 1 litre suya eklenerek hazırlanır:				
Tiamin hidroklorür	750	10 000	–	–
Siyanokobalamin (B_{12})	10	10 000	–	–
Biotin	7.5	10 000	–	–

Birleştirilmiş vitamin stok çözeltisi küçük miktarlar halinde donmuş olarak depolanır. Vitaminler kullanmadan önce ortama kısa eklenir.

NOT 1. Tam bir ortam hazırlarken tuzların çökmesinden kaçınmak için, stok çözeltisinden 500-800 ml iyonu giderilmiş su içine küçük miktarlar ekle ve 1litreye tamamla.

NOT 2. M4 ortamının ilk yayını Elendt, B.P. (1990) de bulunabilir. Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33. içerisinde bulunabilir.

Ek-II

Toplam organik karbon analizi ve deniz yosunu besinlerindeki toc içeriği için bir nomograf üretimi

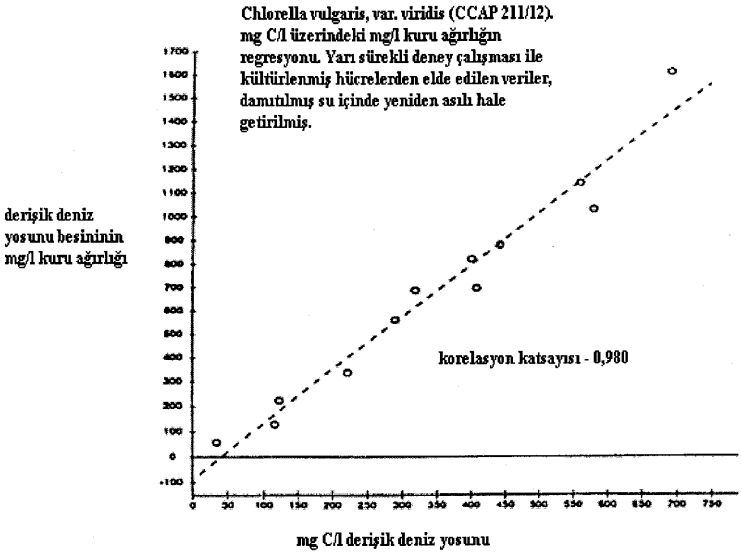
Deniz yosunu besinlerindeki karbon içeriğinin normal olarak doğrudan ölçülemeyeceği fark edilmiştir, fakat korelasyondan (örneğin nomograf) deniz yosunu hücresi sayısı veya ışık absorbansı gibi vasi ölçümlerle gerçekleştirilebilir.

TOC UV metodu ve persülfat yöntemi yerine yüksek sıcaklık yükseltgenmesi ile ölçülebilir. (Bakınız: The Instrumental Det ermination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

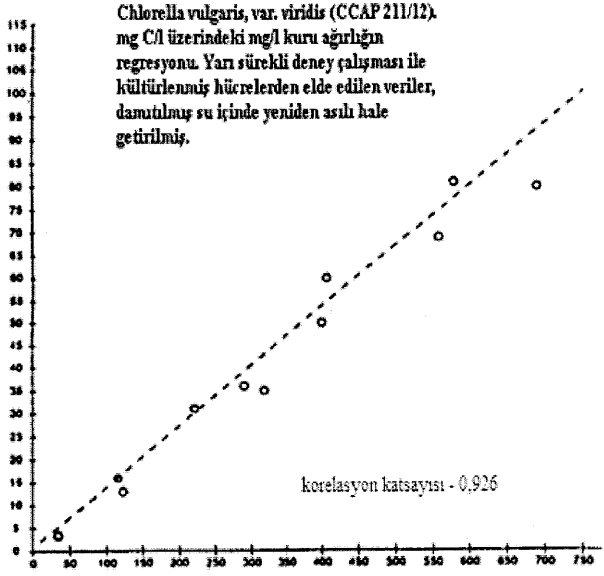
Nomograf üretimi için, deniz yosunu büyüme ortamından santrifüjleme ve takiben damıtılmış su içindeki yeniden süspansiyonlaşma ile ayırılır. Vasi parametreyi ve her örnekteki TOC derişimini üçlü tekrar halinde ölçün. Damıtılmış su kör örnekleri ve deniz yosunu TOC derişimlerinden çıkarılmış TOC derişimleri analiz edilmelidir.

Gerekli olan karbon derişimleri boyunca nomograf doğrusal olmalıdır. Örnekler aşağıda verilmiştir.

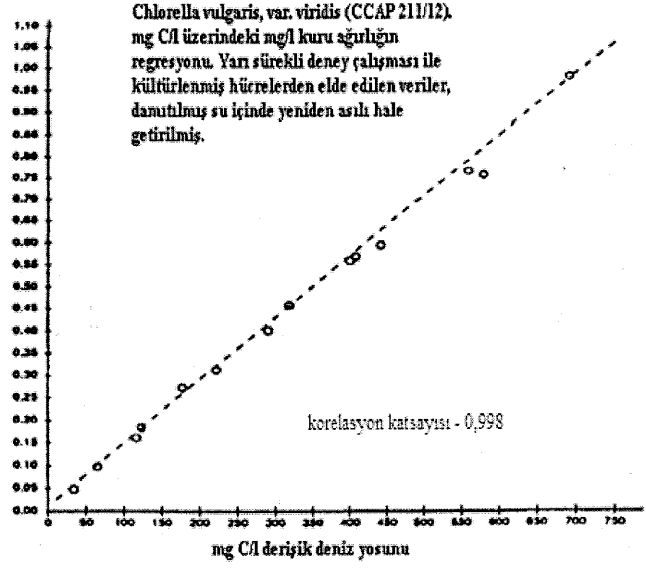
N.B. Bunlar dönüştürmeler için kullanılmamalıdır; her laboratuarın kendi nomografını hazırlaması gereklidir.



Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 211/12). mg C/l üzerindeki mg/l kuru ağırlığın regresyonu. Yarı sürekli deney çalışması ile kültürlenmiş hücrelerden elde edilen veriler, damıtılmış su içinde yeniden asılı hale getirilmiş.



Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 211/12). mg C/l üzerindeki mg/l kuru ağırlığın regresyonu. Yarı sürekli deney çalışması ile kültürlenmiş hücrelerden elde edilen veriler, damıtılmış su içinde yeniden asılı hale getirilmiş.



Ek-III

Ortam yenilemesinde veri kayıt formu örneği, fiziksel/kimyasal izleme verileri, besleme, daphnıa üremesi ve yetişkin ölüm oranı

* deney için hangi kabın kullanıldığını belirtir

‡ herhangi bir yetişkin hayvanın ölüm oranını 'M' olarak ilgili kutucuğa kaydet

† İptal edilen yavruları 'AB' olarak ilgili kutulara kaydet

Deney No:			Verilerin Başlangıcı:			Klon:			Ortam:			BesinTipi:			Test Maddesi:					Tanımlanmış Derişimler:				
Gün	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Ortam yenileme (tik)																								
PH*																							yeni	
																							eski	
O_2 mg/l*																							yeni	
																							eski	
Sıcaklık (°C)*																							yeni	
																							eski	
Sağlanan yiyecek (tik)																								Toplam
Canlı yavru sayısı †																								
Kap 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Toplam	
Toplam yetişkin ölüm oranı ‡																								

Ek-IV

Kimyasal analiz sonuçlarının kaydı için örnEk-Veri kağıdı

(A) Ölçülen derişimler

Tanımlanmış Derişimler	1. Hafta Örneği		2. Hafta Örneği		3. Hafta Örneği	
	Taze	Eski	Taze	Eski	Taze	Eski

(B) Tanımlanan derişimin yüzdesi olarak ölçülen derişimler

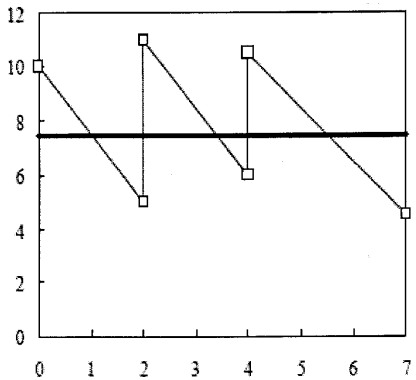
Tanımlanmış Derişimler	1. Hafta Örneği		2. Hafta Örneği		3. Hafta Örneği	
	Taze	Eski	Taze	Eski	Taze	Eski

Ek-V

Bir zaman-ağırlıklandırılmış ortalamanın hesaplanması

Zaman-ağırlıklandırılmış ortalama

Verilen test maddesi derişimi ortam yenilemeleri arısındaki periyot boyunca azalabilir, ebeveyn *Daphnia* tarafından maruz kalınan derişim aralığındaki hangi derişimin temsili olarak seçileceğine karar vermek için gereklidir. Seçim istatistiksel olanlar kadar biyolojik sebepler de esas alınarak yapılmalıdır. Örneğin, eğer üreme maruz kalınan pik derişiminden daha çok etkilendiği düşünülüyorsa, o zaman maksimum derişim kullanılmalıdır. Fakat, toksik maddenin birikmiş veya daha uzun süreli etkileri daha önemli olarak dikkate alınmalıdır, o zaman ortalama derişim daha anlamlıdır. Bu durumda, kullanmak için uygun bir ortalama zaman-ağırlıklandırılmış ortalama derişimdir, çünkü bu süre boyunca derişimdeki anlık değişimleri dikkate alır.



Şekil 1: Zaman-ağırlıklandırılmış ortalama örneği

Şekil 1, Gün 1, 2 ve 4' te ortam yenilemeleri ile 7 gün süren bir testi örnek olarak (basitleştiriliş) gösterir.

- İnce zig zag çizgisi zaman içindeki herhangi bir noktadaki derişimi gösterir. Derişimdeki düşmeden bir üssel bozunma işleminin geleceğine hükmedilir.
- 6 adet çizilen nokta yenilenme periyodunun başında ve sonunda ölçülmüş gözlenen derişimleri gösterir.
- Kalın düz çizgi zaman-ağırlıklandırılmış ortalamanın yerini belirtir.

Zaman-ağırlıklandırılmış ortalama hesaplanır. Bu yüzden zaman-ağırlıklandırılmış ortalama altında kalan alan ile derişim eğrisi altında kalan birbirine eşittir. Yukarıdaki örnek için hesaplama Tablo1' de gösterilmiştir.

Tablo 1: Zaman-ağırlıklandırılmış ortalamanın hesaplanması

Yenileme No	Günler	Derişim 0	Derişim1	Ln(Derişim 0)	Ln(Derişim 1)	Alan
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	19781
					Toplam Alan	50.091
Toplam Gün : 7					TW Ortalaması	7.156

Günler yenileme periyodu içindeki gün sayısıdır.
Derişim 0 her yenileme periyodu başlangıcında ölçülen derişimdir.
Derişim 1 her yenileme periyodu sonundaki ölçülen derişimdir.
Ln(Derişim 0) Derişim 0'ın doğal logaritmasıdır.
Ln(Derişi 1) Derişim 1'in doğal logaritmasıdır.
Alan her yenileme periyodu için üssel eğrinin altında kalan alandır. Şu şekilde hesaplanır:

$$Alan = \frac{Deri\S im0 - Deri\S im1}{Ln(Deri\S im0) - Ln(Deri\S im1)} \text{x } Gün$$

Zaman-ağırlıklandırılmış ortalama (TW Ortalaması) *Toplam gün* tarafından ayrılmış *Toplam alandır.*

Tabiiki, *Daphnia* üreme testi için tablo 21 günü kapsayacak şekilde genişletilmelidir.

Her yenilenme periyodunun başında ve sonunda gözlemler yapıldığında gerçekte üssel olan bozunma işlemini doğrulamak mümkün değildir. Farklı eğriler, farklı *alan* hesaplamaları ile sonuçlanacaktır. Fakat, üssel bozunma işlemi makul olan diğer bilgilerin yokluğunda kullanmak için belki de en iyi eğridir.

Fakat, yenileme periyodu sonunda herhangi bir maddeyi bulmak için yapılan kimyasal analiz başarısız olursa dikkatli çalışma gereklidir. Maddenin çözelti içinde nasıl hızlı bir şekilde gözden kaybolduğunu hesaplamak mümkün olmadıkça, eğri altındaki gerçekçi alanı elde etmek imkansızdır ve dolayısıyla makul zaman-ağırlıklandırılmış ortalama elde etmek de imkansızdır.

C.21. TOPRAK MİKROORGANİZMALARI: AZOT DÖNÜŞÜM TESTİ

1. YÖNTEM

Bu test metodu OECD TG 216 (2000) yöntemi ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu test metodu, bitki koruma ürünlerinden ve diğer olası kimyasallardan birine maruz kalan toprak mikro organizmalarının, azot dönüşüm aktiviteleri üzerindeki uzun vadeli potansiyel etkileri araştırmak üzere dizayn edilmiş bir laboratuvar test metodunu açıklar. Bu test için Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonunun (1) önerileri temel alınmıştır. Aynı zamanda bu testin oluşumunda Alman Federal Biyoloji Enstitüsü (2), Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (3), SETAC (4), Uluslararası Standartlaştırma Organizasyonu (5) önerileride dikkate alınmıştır. 1995 yılında İtalya, Belgirate'de toprak/tortu seçimi üzerine düzenlenmiş olan OECD uygulamalı seminerinde (6) bu testteki toprak çeşidi ve sayısına karar verilmiştir. Toprak örneklerini toplama, elleçleme, ve depolama yöntemleri ile ilgili gereklilikler ISO yönergesi belgesi temel alınarak (7) ve Beligrate şehrindeki uygulamalı seminere göre belirlenmiştir. Test maddelerinin toksik özelliklerinin değerlendirilmesinde toprak mikrobiyal aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi gerekebilir, örneğin bitki koruma ürünlerinin, toprak mikroflorası üzerinde potansiyel yan etkileri ile ilgili veriler veya gerektiğinde bitki koruma ürünlerinden farklı olarak, toprak mikroorganizmalarının kimyasallara maruz kalma ihtimalide göz önünde bulundurulmalıdır. Azot dönüşüm testi, kimyasalların toprakmikroflorası üzerindeki etkisini belirlemek için yürütülür. Tarımsal kimyasallar (örneğin mahsül koruma ürünleri, gübreler, ormancılık kimyasalları) test ediliyorsa hem azot dönüşüm hem de karbon dönüşüm testi yürütülür. Tarımsal kimyasallar dışında kimysallar test ediliyorsa azot dönüşüm testi yeterlidir. Fakat bazı kimyasalların azot dönüşüm testinden elde edilen EC_{50} değerleri, ticari olarak mevcut nitratlaşma inhibitörleri (örneğin nitrapirin) değerleri aralığındaysa, daha fazla bilgi elde etmek için karbon dönüşüm testi uygulanabilir.

Toprak kompleks veya heterojen karışım halinde canlı ve cansız varlıkları barındırır. Verimli topraklardaki organik maddelerin bozunmasında ve dönüşümünde verimliliğe farklı katkılar sağlayan diğer türler gibi mikroorganizmaların da önemli rolü vardır. Biyokimyasal yöntemlerdeki herhangi bir uzun vadeli engelleme besin döngüsünü ve toprak verimliliğini olumsuz etkiler. Bütün verimli topraklarda karbon ve azot dönüşümü olur. Bu dönüşümlerdeki mikrobiyal topluluklar topraktan toprağa farklılık gösterse de dönüşüm basamakları aynıdır.

Bu açıklanan test metodu, maddenin, aerobik yüzey topraklarındaki azot dönüşümü üzerindeki uzun vadeli olumsuz etkilerini saptamaya yarar. Aynı zamanda bu test maddelerin, karbon dönüşümü üzerindeki etkisini toprak mikroflorasıvasıtasıyla bulmaya yarar. Nitrat, karbon-azot bağının bozunumuyla oluşur. Bundan dolayı işlemden geçmiş ve kontrol topraklarında eşit hızlarda nitrat oluşumu varsa buradaki ana karbon bozunumu işlemi sağlam ve iş görür durumdadır. Test için seçilen substrat'ın (toz hale getirilmiş kabayonca besini) uygun bir karbon azot oranı vardır (genellikle 12/1 ve 16/1 arasındadır). Bu yüzden test esnasında karbon açlığı azalmıştır ve eğer mikrobiyal topluluklar kimyasallar tarafından zarar gördüyse 100 gün içerisinde düzelebilirler.

Bu test yönteminde geliştirilen testler toprağa ulaşan madde miktarını tahmin etmeye yöneliktir. Bölgedeki bitki koruma ürünlerinin uygulama oranının bilindiği durumlar örnek olarak gösterilebilir. Tarımsal kimyasallar için tahmin edilen veya umulan uyguluma oranı ile ilgili iki dozun testi yeterlidir. Tarımsal kimyasallar aktif madde veya formüle edilen ürünler olarak test edilebilir. Ama bu test sadece tarımsal kimyasallarla sınırlı değildir. Toprağa uygulanan test maddesinin miktarını değiştirerek ve verileri değerlendirme yöntemini değiştirerek, testi toprağa ulaşacak madde miktarını bilinmeyen kimyasallar için de kullanabiliriz. Böylece tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasalların farklı konsantrasyonlarının azot dönüşümüne olan etkileri belirlenir.. Bu testlerden elde edilen verilerle doz-cevap eğrisi çizilir ve EC_x değerleri hesaplanır (x , % etkidir).

1.2. Tanımlar ve birimler

Azot Dönüşümü: Azot içeren organik maddelerin nitratlaştırma ve amonyaklaşma işlemi ile mikroorganizmalar tarafından en iyi şekilde bozunarak, son ürün olan anorganik nitrata dönüşmesidir.

EC_x (Etkin Konsantrasyon): Azotun nitrata dönüşümündeki toprak içindeki yüzde x engellemeye sebep olan test maddesinin topraktaki konsantrasyonudur.

EC_{50} (Ortanca etkin Konsantrasyon): Azotun nitrata dönüşümünün %50 oranında engellenmesine sebep olan topraktaki test maddesi konsantrasyonudur.

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yönteminin ilkesi

Elenmiş toprak toz halindeki bitki yiyeceğiile iyileştirilir, ya test maddesiyle işlemden geçirilir ya da hiç bir işleme tabi tutulmaz (kontrol). Eğer tarımsal kimyasallar test ediliyorsa, en az iki test konsantrasyonu gereklidir ve bunlar alandaki umulan en yüksek konsantrasyon oranları olarak seçilir. 0, 7, 14 ve 28 günlük inkübasyon döneminden sonra uygun bir çözücü ile işlemden geçirilen toprak ürünleri ve işleme tabii tutulmayan toprak ürünleri özütlenir, özüt içindeki nitrat miktarı belirlenir. İşlemden geçirilen topraktaki nitrat oranı ile işleme tabi tutulmayan topraktaki (kontrol) nitrat oranı kıyaslanarak yüzde sapma hesaplanır. Bütün testler en az 28 gün sürer. Fakat 28. günün sonunda işlemden geçirilen toprak ile işleme tabii tutulmayan toprak arasındaki fark eşit veya farkı % 25'ten fazlaysa ölçümlere maksimum 100 güne kadar devam edilir. Eğer tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa, test maddesinden farklı konsantrasyonlarda toprak örneğine eklenir, 28 günlük bir inkübasyon döneminden sonra işlemden geçirilen toprak ile işleme tabi tutulmayan topraktan (kontrol) oluşan nitrat miktarları ölçülür. Birden fazla konsantrasyon sonucu veren testlerde bir regresyon modeli analizi yapılır ve EC_x değerleri hesaplanır (örneğin EC_{50}, EC_{25} ve/veya EC_{10}). Bakınız tanımlar.

1.5. Testin geçerliliği

Tarımsal kimyasalların test sonuçlarının değerlendirilmesi muamele edilmiş toprak örnekleri ve kontrol örneklerindeki nitrat konsantrasyonları arasındaki farkların nispeten az olması (ortalama değer ±25 %) temeline dayanır, bu yüzden kontroldeki büyük değişimler yanlış

sonuçlara işaret eder. Bu yüzden kontroldeki işleme tabi tutulmayan (kontrol) toprak örneklerini tekrarları arasındaki fark ±15% den az olmalıdır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Cihazlar

Tepkimeye girmeyen kimyasal malzemelerden yapılmış test kapları kullanılır. Toprakların inkübasyonunda kullanılan prosedür ile uyum içerisinde uygun kapasitede olmalıdır (Bakınız bölüm 1.7.1.2). Test sırasında su kaybını en aza indirmeye ve gaz alış verişini sağlamaya dikkat edilmelidir (örneğin kaplar delikli polietilen folyo ile kaplanabilir). Uçucu maddelerin test edildiği durumlarda, sızdırmaz halde kullanılabilen ve gaz tutucu kaplar kullanılmalıdır. Bu kaplar, hacimlerinin dörtte birini toprak örneğinin dolduracağı boyutta olmalıdırlar.

Aşağıdaki standart laboratuvar cihazları kullanılmaktadır :

- karıştırıcı cihaz : mekanik karıştırıcı veya eşdeğer cihaz;
- santrifüj (3000 g) veya süzme aparatı (nitrat içermeyen filtre kağıdı kullanarak);
- nitrat analizi için yeterli tekrarlanabilirlikteki ve hassasiyetteki cihaz.

1.6.2. Toprak seçimi ve sayısı

Yalnız bir toprak kullanılır. Önerilen toprağın özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

- kum içeriği : %50' den az olmayan ve %75' ten fazla olmayan.
- pH : 5,5-7,5
- organik karbon içeriği: % 0,5 – 1,5
- mikrobiyal biyolojik kütlesi ölçülmeli (8)(9) ve karbon içeriği toplam toprağın organik karbon içeriğinin en az %1'i olmalıdır.

Çoğu durumda bu özellikleri taşıyan topraklar en kötü durumu temsil eder, çünkü, test kimyasalının absorpsiyonu minimum ve mikrofloralara olan uygunluğu maksimumdur. Sonuç olarak diğer topraklarla test edilmesi genel olarak gereksizdir. Fakat bazı durumlarda örneğin test maddesinin asidik orman toprağında bulunması durumunda veya elektrostatik olarak yüklü kimyasallar için, ek toprak çeşitleri kullanmak gerekli olabilir.

1.6.3. Toprak örneklerinin toplanması ve depolanması

1.6.3.1. Toplama

Toprak örneklerinin toplama alanlarının tarihi hakkında detaylı bilgiler mevcut olmalıdır. Bilgilerde kesin olarak toplama yerleri, yerin bitki örtüsü, bitki koruma ürünleriyle muamele edildiği tarihleri, organik ve anorganik gübrelerle muamele edildiği tarihleri ve biyolojik malzemelerin eklenmesi veya kazara meydana gelen kirlenme durumları belirtilir. Toprak toplanması için seçilen alan uzun vadede kullanılabilir olmalı. Sonsuz otlaklar, yıllık tahıl tohumları içeren alanlar (mısır hariç) veya yoğun yeşil ekili gübreli alanlar uygundur. Toplama için seçilen alanın örneklemeden önce en az bir yıldır bitki koruma ürünlerine maruz kalmamış olması gerekir. Aynı zamanda herhangi bir organik gübrenin toplama işleminden önce altı aydır toprağa uygulanmamış olması gerekir. Mineral gübre kullanımı sadece bitkinin gereksinimlerine uyumlu olduğunda kabul edilebilirdir ve gübre uygulamasından en az üç ay geçmeden toprak örnekleri alınmamalıdır. Biyosidal etkileri (örneğin kalsiyum siyanamid) olan gübrelerin kullanıldığı alanlardan toprak toplanmasından kaçınılmalıdır.

Uzun süreli kuraklık (30 günden fazla) dönemlerinin hemen ardından veya toprağın su ile doygun olduğu durumlarında örnekleme yapmaktan kaçınılmalıdır. Sürülmüş topraklardan örnekler 0 ile 20 cm' lik derinliklerden alınmalıdır. Uzun zamandır sürülmemiş topraklardan (en az bir büyüme sezonu) ise örnekler yerin 20 cm' den biraz daha fazla derinliğinden alınmalıdır (25 cm' ye kadar). Toprak örnekleri uygun kaplarda ve toprağın ilk özelliğini belirgin biçimde değiştirilmemesini garanti edecek sıcaklık altında taşınmalıdır.

1.6.3.2. Depolama

Alandan taze toplanmış topraklar tercih edilir. Laboratuvarda depolanması kaçınılmazsa 4 ± 2 °C' de karanlıkta maksimum üç ay depolanabilir. Depolama esnasında aerobik koşullar sağlanmalıdır. Eğer toprak örnekleri en az üç yıl boyunca donmuş olarak bulundukları bir yerden toplanmışsalar -18 °C ile -22 °C arasında 6 ay boyunca depolanabilirler. Depolanan toprakların mikrobiyal biyolojik kütlesi her deneyden önce ölçülür ve biyolojik kütledeki karbon toplam toprak organik karbon içeriğinin %1'i olmalıdır (Bakınız bölüm 1.6.2).

1.6.4. Test için toprağın elleçlenmesi ve hazırlanması

1.6.4.1. Ön inkübasyon

Toprak depolanmışsa (Bakınız bölüm 1.6.3.2) 2 ile 28 gün arasında ön inkübasyon gerekir. inkübasyon esnasında toprağın sıcaklığı ve nem içeriği testte kullanılan nem ve sıcaklık ile benzer olmalıdır (Bakınız bölüm 1.6.4.2 ve 1.7.1.3).

1.6.4.2 Fiziksel – Kimyasal özellikler

Toprak el ile büyük parçacıklardan (taş, bitki parçaları vb.) temizlenir ve daha sonra fazla kurutma olmaksızın 2 mm' den daha küçük veya eşit olacak şekilde nemli elekten geçirilir. Toprağın nem oranı, %40 ve % 60' lık maksimum su tutma kapasitesini geçmeyecek şekilde saf veya iyonu giderilmiş su ile ayarlanmalıdır.

1.6.4.2. Organik substrat ile iyileştirme

Toprak uygun bir organik substrat ile iyileştirilmelidir. Bu amaç için örneğin toz haline getirilmiş C/N oranı 12/1 ve 16/1 arasında olan bir kabayonca-çimi-yeşil yiyecek (ana bileşen: *Medicago sativa*) kullanılabilir. Gerekli olan kabayonca-toprak oranı kilogram toprak başına (kuru ağırlık) 5 g kabayoncadır.

1.6.5. Toprağa uygulanacak olan test maddesinin hazırlanışı

Test maddeleri genellikle bir taşıyıcı kullanarak toprağa uygulanır. Bu uygun taşıyıcı su veya ince kuartz toprağı gibi (partikül boyutu: 0,1-0,5 mm) etkisiz (inrt) bir katı olabilir. Su dışındaki sıvı taşıyıcılardan (örneğin, aseton, kloroform gibi organik çözücüler) kaçınılmalıdır çünkü mikroflorayı zedeleyebilirler. Taşıyıcı olarak kum kullanılırsa uygun çözücüde çözünmüş veya süspansiyon haline getirilmiş test maddesi ile kaplanabilir. Böyle durumlardaçözücü toprağa karışmadan buharlaştırılarak uzaklaştırılmalıdır. Test maddesinin toprakta optimum yayılımı için 10g kum/1kg (kuru ağırlık) toprak oranı gereklidir. Kontrol örnekleri yalnız eş değer miktardaki su ve/veya kuartz kumu ile muamele edilir.

Uçucu kimyasallar test edildiğinde muamele esnasında madde kaybı mümkün olduğunca engellenmeli ve toprakla homojen bir dağılım elde edildiğinden emin olunması için çaba gösterilmelidir (örneğin test maddesi farklı bölgelerden toprağa enjekte edilmelidir).

1.6.6. Test konsantrasyonları

Tarımsal kimyasallar test ediliyorsa en az iki tane konsantrasyon kullanılmalıdır. Düşük konsantrasyon elverişli koşullarda toprağa ulaşacak maksimum miktarı simgelerken; yüksek konsantrasyon düşük konsantrasyonun birkaç katı olmalıdır. Toprağa eklenen test maddesinin konsantrasyonu 5 cm' lik bir derinlik ve 1,5 toprak yoğunluğuna uygun olarak hesaplanır. Toprağa doğrudan uygulanan tarımsal kimyasallar için veya toprağa ulaşan miktarı tahmin edilen kimyasallar için, gerekli test konsantrasyonları Tahmini Çevresel Konsantrasyondur (Predictable Environmental Concentration, PEC) ve bu konsantrasyonunun 5 katıdır. Toprağa bir sezonda çeşitli zamanlarda uygulanması umulan maddeler umulan en yüksek uygulama sayısı ile PEC' in çarpılmasıyla elde edilmiş konsantrasyonlarda test edilmelidir. Test edilen yüksek konsantrasyon bir kerede uygulanan maksimum uygulama oranının on katını geçmemelidir. Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa geometrik seriler halinde en az beş konsantrasyon kullanılır. Bu test konsantrasyonları ECx değerlerini bulmaya yönelik aralığı kapsamalıdır.

1.7. Testin performansı

1.7.1. Maruz kalma koşulları

1.7.1.1. İşlem ve kontrol

Tarımsal kimyasallar test ediliyorsa toprak eşit ağırlıktaki üç eşit parçaya ayrılır. iki kısmı ürünü içeren taşıyıcı ile karıştırılırken, diğer kısmı ürün içermeyen taşıyıcı ile karıştırılır (kontrol). Hem işlemeden geçmiş hem de işleme tabi tutulmamış toprak örnekleri için en az üçer tane paralel örneğe ihtiyaç vardır. Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa toprak altı eşit ağırlıklı parçaya bölünür. Beş parçası test maddesi içeren taşıyıcı ile karıştırılırken altıncı parçası kimyasal içermeyen taşıyıcı ile karıştırılır. Hem işlemeden geçmiş hem de işleme tabi tutulmamış toprak için en az üçer tane paralel örneğe ihtiyaç vardır. İşlenmiş toprak örneklerinde test maddelerinin homojen dağılımına dikkat edilmelidir. Karıştırma esnasında, toprağın sıkıştırılmasından veya yuvarlanmasından kaçınılmalıdır.

1.7.1.2. Toprak örneklerinin inkübasyonu

Toprak örneklerinin inkübasyonu iki yolla uygulanır: birincisi işlemden geçmiş ve işlemden geçmemiş toprağın yığın halinde örnekleriyle veya işlemden geçmiş ve işlemden geçmemiş her biri eşit boyuta ayrılmış bir toprak örnekleri serisi halinde inkübasyon yapılır. Uçucu örneklerin testindeyse, seri halindeki ayrı ayrı örneklerle yapılmalıdır. Topraklar yığın halinde inkübasyon yapıldığında, işlenmiş ve işlenmemiş toprakların büyük miktarları hazırlanır ve test esnasında analiz etmek için gerektikçe küçük örnekler alınır. Her işlem ve kontrol için ilk başta hazırlanan miktar, küçük miktardaki örneklerin boyutuna, analizlerde kullanılan benzer küçük örneklerin sayısına ve umulan en fazla örnekleme zamanı sayılarına bağlıdır. Yığın halinde inkübasyon yapılan toprak küçük örnekler alınmadan önce tamamen karıştırılmalıdır. Topraklar tek tek seriler halinde inkübasyon yapıldığında, her işlemden geçmiş ve geçmemiş yığın örnek gerektiği kadar küçük örnek gruplarına bölünür ve bunlar gerektiği şekilde kullanılır. Deneylerde iki örnekleme zamanından daha fazlası beklendiğinde, bütün tekrarlar

ve örnekleme zamanları için yeterli miktarda küçük örnek hazırlanmalıdır. Test toprağının en az üç eş örneği, aerobik koşullarda inkübasyon yapılmalıdır (Bakınız bölüm 1.7.1.1). Bütün testler esnasında, aerobik olmayan koşulların oluşmasından kaçınmak için yeterli kafa boşluğu olan uygun kaplar kullanılmalıdır. Uçucu maddeler test edilirken, test yanlızca küçük örnekler halindeki seriler ile yürütülmelidir.

1.7.1.3. Test koşulları ve süresi

Test oda koşullarında 20±2 °C' de karanlıkta uygulanır. Toprağın nem oranı,test esnasında %40 ve % 60'lık maksimum su tutma kapasitesi aralığını geçmeyecek şekilde %±5 aralığında korunmalıdır. Saf su veya iyonu giderilmiş su gerektiğinde eklenebilir.

Testlerin minimum süresi 28 gündür. Eğer tarımsal kimyasallar test ediliyorsa nitrat oluşum oranları işlemden geçen ile kontrol toprak örnekleri arasında karşılaştırılır. Ama 28. günün sonunda işlemden geçirilen toprak ile işleme tabi tutulmayan toprak (kontrol) arasındaki fark %25' ten fazlaysa ölçümlere fark %25' den az olana veya eşit olana kadar veya daha kısa da sürebilecek şekilde maksimum 100 güne kadar devam edilir. Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar için test 28 gün sonra bitirilir. 28'inci günde işlemden geçirilen toprak ile işleme tabi tutulmayan topraktaki (kontrol) nitrat miktarı belirlenir ve ardından EC_x değerleri hesaplanır.

1.7.2. Toprağın seçimi ve analizi

1.7.2.1. Toprak örnekleme planı

Tarımsal kimyasallar test ediliyorsa 0., 7., 14., ve 28., günlerde toprak örneklerinitrat için analiz edilir. Eğer daha uzun bir test gerekiyorsa 28 günden sonra 14 günlük aralıkla daha sonraki ölçümler yapılmalıdır.
Eğer tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa en az 5 test konsantrasyonu kullanılır ve başlangıçta (0. gün) ve maruz kalma periyodunun sonunda (28. gün) toprak örnekleri nitrat için analiz edilir. Gerekli görüldüğü takdirde ara günlerin birisinde (örneğin 7. günde) bir ölçüm daha yapılabilir. 28. günde elde edilen verilerle kimyasal için EC_x değeri hesaplanabilir. İstendiği takdirde topraktaki nitratın başlangıçtaki miktarını rapor etmek için 0. günden elde edilen veriler kullanılabilir.

1.7.2.2. Toprak örneklerinin analizi

İşlemden geçirilmiş örneklerde ve kontrol örneklerinde oluşan nitrat miktarı her örnekleme zamanına göre saptanır. Toprak örneğinin uygun bir çözücüde (0.1 M KCl) çalkalanmasıyla topraktaki nitrat özütlenir. Eşdeğer gram kuru toprak başına 5 ml KCl çözeltisi oranı gereklidir. Özütlemeyi optimize etmek için toprağı ve özütleme çözeltisini taşıyan kabın yarıdan fazlası dolu olmamalıdır. İçindeki karışım 60 dakika 150 rpm'de çalkalanır. Karışım santrifüjlenir veya süzülür ve sıvı kısım nitrat için analiz edilir. Katı parçacık içermeyen sıvı kısım analiz edilmeden önce 6 aya kadar 20±5 derecede depolanabilir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların işlenmesi

Tarımsal kimyasalların testi söz konusuysa; oluşan nitrat miktarı her toprak testi tekrarı için ayrı ayrı hesaplanmalı ve ortalama değeri bulunarak tablo hazırlanmalıdır. Azot dönüşüm oranları uygun ve genel olarak kabul edilen istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmelidir (örneğin F-testi, %5 değer seviyesinde).Oluşan nitrat miktarları mg nitrat/kg kuru toprak ağırlığı/gün şeklinde ifade edilir. Her işlemde oluşan nitrat miktarı teste tabi tutulmayan toprak örneğiyle (kontrol ile) kıyaslanır ve kontrolden yüzde sapma hesaplanır.

Eğer test tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar için yapılıyorsa, her tekrar analizinde oluşan nitrat miktarı belirlenir ve EC_x değerlerinin hesaplanması için doz-cevap eğrisi çizilir. 28. günün sonunda işlemden geçmiş örneklerden bulunan nitrat miktarları (örneğin mg nitrat/kg kuru toprak ağırlığı) ile işleme tabi tutulmayan toprak örneği (kontrol) kıyaslanır. Bu veriler doğrultusunda her test konsantrasyonu için % engelleme değerleri hesaplanır. İstatistiksel prosedürler kullanılarak bu yüzdelere karşı konsantrasyon grafiğinden EC_x değerlerine ulaşılır. Aynı zamanda hesaplanmış EC_x için standart prosedürler kullanılarak güven aralığında ($p = 0,95$) belirlenir (10)(11)(12).

Yüksek oranda azot içeren test örnekleri test sırasında oluşan nitrat miktarına katkıda bulunabilir. Eğer yüksek konsantrasyonda (örneğin tekrarlanan uygulamalarda kullanılması düşünülen kimyasallar) bu tür örnekler test ediliyorsa teste uygun kontrol örnekleri dahil edilmelidir (örneğin toprak ile birlikte test maddesi fakat bitki besini olmadan). Bu kontrollerden elde edilen veriler EC_x değerlerinin hesaplanmasında dikkate alınmalıdır.

2.2. Sonuçların yorumlanması

Tarımsal kimyasalların test sonuçları değerlendirildiğinde daha düşük muamele (örneğin maksimum tahmin edilen konsantrasyon) ile kontrol nitrat oluşum oranlarıarasındaki fark, 28 gün sonundaki herhangi bir örnekleme zamanında, birbirine eşit veya %25 ten az ise ürün toprakta uzun vadede azot dönüşümüne etkisi olmayan bir ürün olarak değerlendirilir. Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasalların kullanımından elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde EC_{50} EC_{25} ve/veya EC_{10} değerleri kullanılır.

3. RAPORLAMA

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir.

Kullanılan toprağın eksiksiz tanımıyla birlikte aşağıdakileri içerir:

- bölgenin coğrafi referansı (enlem, boylam);
- alanın geçmişi hakkında bilgi (örneğin bitki örtüsü, bitki koruma ürünleri ile muamelesi, gübrelerlerle muamele, kazara gerçekleşen kirlilikler, vs.);
- Kullanım tipi (örneğin, tarımsal toprak, orman, vb.)
- Örneğin çıkarıldığı derinlik (cm);
- kum/ alüvyon/kil içeriği (% kuru ağırlık);

- pH (suda);
- organik karbon içeriği (% kuru ağırlık);
- azot içeriği (% kuru ağırlık);
- başlangıçtaki nitrat konsantrasyonu (mg nitrat/kg kuru ağırlık);
- katyon değişim kapasitesi (mmol/kg);

- toplam organik karbon yüzdesi şeklinde ilk baştaki mikrobiyal biyolojik kütle;
- her parametrenin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin referansı;
- toprak örnekleriyle ilgili tüm toplama ve depolama bilgileri;
- eğer varsa ön inkübasyon detayları;

Test maddesi :
- fiziksel durumu, gerektiğinde, fiziksel-kimyasal özellikleri;
- kimyasal tanımlama verileri, gerektiğinde, yapısal formülü, saflığı (örneğin bitki koruma ürünleri için aktif içeriğin yüzdesi, azot içeriği.

Substrat:
- substrat kaynağı;
- bileşim (örneğin kabayonca besini, kabayonca-çim-yeşil besini);
- karbon, azot içeriği (% kuru ağırlık);
- elek genişliği (mm).

Test koşulları:
- toprağın organik substratla iyileştirilmesinin ayrıntıları;
- kullanılan test kimyasallarının konsantrasyon sayısı, uygun olduğunda, seçilen konsantrasyonların haklı gerekçeleri;
- test maddesinin toprağa uygulanmasının ayrıntıları;
- inkübasyon sıcaklığı;
- toprağın başlangıçtaki ve test süresince nem oranı;
- kullanılan toprak inkübasyon yöntemi (örneğin yığın olarak veya küçük örnek serileri halinde);
- tekrar sayısı
- örnekleme zamanları;
- nitratın topraktan özütlenmesi için kullanılan yöntem;

Sonuçlar :
- nitrat analizinde kullanılan analitik işlem ve donanım;
- her biri için tek tek ve ortalama nitrat miktarını içeren tablo halindeki veriler;
- işlemden geçen ve işleme tabi tutulmayan örnek (kontrol) arasındaki değişiklik;
- anlamlı ise, hesaplamalarda yapılan düzeltmelerin açıklaması;
- her örnekleme zamanındaki nitrat oluşum oranlarındaki yüzde değişim, eğer uygunsa, % 95 güven ağırlığıyla birlikte EC50, diğer ECx değerleri güven aralıkları ile birlikte ve doz-cevap eğrisinin grafiği;
- sonuçlara uygulanan istatistiksel işlemler;
- Sonuçların yorumlanmasında yardımcı olabilecek tüm bilgi ve gözlemler.

4. KAYNAKLAR

(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) TS ISO 14238. Toprak Kalitesi- Biyolojik Metotlar- Topraklarda Azot Mineralizasyonunun ve Nitrifikasyonunun Tayini- Bu İşlemlere Kimyasal Maddelerin Etkisi .

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) TS ISO 10381-6 Toprak Kalitesi-Numune Alma Bölüm 6-Toprakların Aerobik Mikrobiyal Faaliyetlerinin Laboratuvar Şartlarında Değerlendirilmesi İçin Numune Alma, Taşıma ve Muhafaza Kuralları

(8) TS ISO 14240-1 Toprak Kalitesi- Toprak Mikrobiyal Biyokütlesi Tayini- Bölüm 1: Substratla Hızladırılmış Solunum Metodu

(9) TS ISO 14240-2 Toprak Kalitesi- Toprak Mikrobiyal Biyokütlesi Tayini- Tütsüleme Özütleme Metodu

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C. 22. TOPRAK MİKROORGANİZMALARI: KARBON DÖNÜŞÜM TESTİ

1. YÖNTEM

Bu test yöntemi OECD TG 217 (2000) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu test metodu, mahsul koruma ürünlerinden ve diğer olası kimyasallardan birine maruz kalan toprak mikro organizmalarının, karbon dönüşüm aktiviteleri üzerindeki uzun vadeli potansiyel etkileri araştırmak üzere dizayn edilmiş bir laboratuar test metodunu açıklar. Bu test için Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonunun (1) önerileri temel alınmıştır. Aynı zamanda bu testin oluşumunda Alman Federal Biyoloji Enstitüsü (2), Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (3), SETAC (4), Uluslararası Standartlaştırma Organizasyonu (5) önerileri de dikkate alınmıştır. 1995 yılında İtalya, Belgirate'de toprak/tortu seçimi üzerine düzenlenmiş olan OECD uygulamalı seminerinde (6) bu testteki toprak çeşidi sayısına karar verilmiştir. Toprak örneklerini toplama, elleçleme, ve depolama yöntemleri ISO yönergesi belgelerinde (7) ve Beligrate uygulamalı seminerinde önerilmiştir.

Test maddelerinin toksik özelliklerinin değerlendirilmesinde toprak mikrobiyal aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi gerekebilir. Örneğin bitki koruma ürünlerinin toprak mikroflorası üzerinde potansiyel olumsuz etkileri ile ilgili veriler veya gerektiğinde bitki koruma ürünlerinden farklı olarak, toprak mikroorganizmalarının kimyasallara maruz kalma ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır. Karbon dönüşüm testi, toprak mikroflorasının üzerindeki kimyasalların etkisini belirler. Tarımsal kimyasallar (örneğin gübre, bitki koruma ürünleri, orman kimyasalları) test ediliyorsa hem azot dönüşümü hem de karbon dönüşüm testi yürütülür. Tarımsal kimyasallar dışında kimyasallar test ediliyorsa azot dönüşüm testi yeterlidir. Fakat bazı kimyasalların azot dönüşüm testinden elde edilen EC_{50}değerleri, ticari olarak mevcut nitratlaşma inhibitörleri (örneğin nitrapirin) değerleri aralığındaysa, daha fazla bilgi elde etmek için karbon dönüşüm testi uygulanabilir.
Toprak kompleks veya heterojen karışım halinde canlı ve cansız varlıkları barındırır. Verimli topraklardaki organik maddelerin analizinde ve dönüşümünde mikroorganizmaların önemli rolü vardır. Biyokimyasal yöntemlerdeki herhangi bir uzun vadeli engelleme besin döngüsünü ve toprak verimliliğini olumsuz etkiler. Bütün verimli topraklarda karbon ve azot dönüşümü olur. Bu dönüşümlerdeki mikrobiyal toplulukları topraktan toprağa farklılık gösterse de dönüşüm basamakları aynıdır

Bu test metodu maddenin, aerobik yüzeyli topraktaki karbon dönüşüm prosesine uzun dönemli önemsiz etkisini saptamaya yarar. Test karbon dönüşümünden sorumlu olan mikrobiyal topluluklarının aktivitesindeki ve büyüklüğündeki değişikliğe bağlı olarak hassasiyet gösterir ne de olsa bu toplulukların hem kimyasal stresine hem de karbon açlığına sebep olur. Organik maddesi az olan kumlu bir toprak kullanılmaktadır. Bu toprak test maddeleriyle işlenir ve hızlı mikrobiyal metabolizma koşulları altında üretilir. Bu koşullar altında topraktaki karbon kaynakları hızlıca yok olmaktadır. Bu durum mikrobiyal toplulukların ölmesine ve karbon açlığına neden olur. Test 28 günden fazla sürerse, mikrobiyal biyolojik kütledeki kademeli azalışa bağlı olarak reaksiyonların toplamı ölçülebilir (7). Bir kimyasalın etkisiyle karbon-stresli topraktaki biyokütle değişirse eski kütlesine dönemeyebilir. Bundan dolayı testin herhangi bir zaman diliminde test maddesinin sebep olduğu herhangi bir bozukluk çoğunlukla testin sonuna kadar devam edecektir.

Bu yöntemdeki testler toprağa ulaşan madde miktarını tahmin etmeye yöneliktir. Tarımsal kimyasallar için tahmin edilebilen uyguluma oranına yakın iki dozun testi söz konusudur. Tarımsal kimyasallar aktif madde veya formüle edilen ürün olarak test edilebilir. Ama bu test sadece çevresel konsantrasyonları belirlenebilen tarımsal kimyasallar için değildir. Toprağa uygulanan test maddenin miktarını değiştirerek ve verilerin değerlendirme yöntemini değiştirerek, testi toprağa ulaşacak madde miktarı bilinmeyen kimyasallar içinde kullanabiliriz. Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallarda konsantrasyonun azot dönüşümüne etkisi saptanır. Bu testlerden elde edilen verilerle doz-cevap eğrisi çizilir ve EC_X değerleri hesaplanır (X , % etkidir).

1.2. Tanımlar ve birimler

Karbon Dönüşümü: Bozunmayla mikroorganizmalar tarafından organik maddeden anorganik maddeye, son ürün olan karbondioksite dönüşmesidir.

EC_X (Etkin konsantrasyon): Karbonun karbondioksite dönüşümünde toprak içindeki yüzde x engellemeye sebep olan test maddesinin topraktaki konsantrasyonudur.

EC_{50} (Ortanca etkin konsantrasyon): Karbonun karbondioksite dönüşmesini %50 oranda engellemeye sebep olan test maddesinin topraktaki konsantrasyonudur.

1.3. Referans maddeler

Yok.

1.4. Test yöntemin ilkesi

Elenmiş toprak ya test maddesiyle işlemden geçirilir yada hiç bir işleme tabi tutulmaz (kontrol). Eğer tarımsal kimyasallar test ediliyorsa, minimum 2 test derişimi önerilir ve bunlar alandaki en yüksek derişim oranları olarak seçilir. 0, 7, 14 ve 28 günlük inkübasyon döneminden sonra işlemden geçen ve geçmeyen toprak örnekleri glikoz ile karıştırılır ve 12 saat süreyle saat başı glikozdan kaynaklanan teneffüs oranının ölçümleri alınır. Teneffüs oranı, karbondioksit salınımı (mg karbondioksit/kg kuru toprak/saat) veya oksijen tüketimi (mg oksijen/kg toprak/saat) olarak belirtilir. İşlemden geçirilen topraktaki solunum oranı ile işleme tabi tutulmayan topraktaki solunum oranı kıyaslanarak yüzde sapma hesaplanır. Bütün testler en az 28 gün sürer. Ama 28. günün sonunda işlemden geçirilen toprak ile işleme tabi tutulmayan toprak arasında fark yok veya farkı %25'ten fazlaysa ölçümlere 14 günlük aralar halinde maksimum 100 güne kadar devam edilir. Eğer tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa, test maddesinden farklı konsantrasyonlarda toprak örneğine eklenir, 28 günlük bir inkübasyon döneminden sonra glikozla muamele edilerek elde edilen teneffüs oranı (örneğin, oluşan karbon dioksitin veya tüketilen oksijenin ortalaması)ölçülür. Konsantrasyon serisi testlerinden elde edilen sonuçların regresyon modeli analizi yapılır ve EC_x değerleri hesaplanır (örneğin, EC_{50}, EC_{25} ve/veya EC_{10}). Bakınız tanımlar.

1.5. Testin geçerliliği

Tarımsal kimyasallarla işlemden geçirilen toprak örneğinden ve işleme tabi tutulmayan (kontrol) toprak örneğinden açığa çıkan karbondioksit miktarı veya harcanan oksijen miktarları arasındaki büyük farklar hatalı sonuca götürür. Bu yüzden işleme tabi tutulmayan (kontrol) toprak örnekleri ve benzerleri arasındaki fark ±15% den az olmalıdır.

1.6. Test yönteminin tanımlanması

1.6.1. Cihazlar

Test kapları tepkimeye girmeyen (inert) kimyasal malzemelerden yapılır. İnkübasyonda kullanılan toprak prosedür ile uyum içerisinde olmalıdır (Bakınız bölüm 1.7.1.2). Test sırasında su kaybını önlemeye ve gaz alış verişini sağlamaya dikkat edilmelidir (örneğin kaplar delikli polietilen folyo ile kaplanabilinir). Uçucu maddeler test edildiğindeyse sızdırmaz ve gaz tutucu kaplar kullanılmalıdır. Bu kaplar, hacimlerinin dörtte birini toprak örneğinin dolduracağı boyutta olmalıdırlar.
Glikoz varlığında teneffüs tayini için karbondioksit oluşumunun ve oksijen tüketiminin ölçümünü yapan cihazlara ve muamele sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu sistemlere ve cihazlara örnekler (8)(9)(10)(11) da bulunmaktadır.

1.6.2. Toprak seçimi ve sayısı

Yalnız bir toprak kullanılır. Önerilen toprağın özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

- kum içeriği : %50' den az %75' ten fazla olmamalıdır;
- pH : 5.5 - 7.5;
- organik karbon içeriği: % 0. 5 – 1. 5
- mikrobiyal biyolojik kütlesi ölçülmeli (12)(13) ve karbon içeriği toplam toprağın organik karbon içeriğinin en az %1'i olmalıdır.

Çoğu durumda bu özellikleri taşıyan topraklar en kötü durum senaryosudur çünkü test kimyasalının absorpsiyonu en aza indirilir ve mikrofloralara olan elverişliliği maksimumdur. Sonuç olarak diğer topraklarla test edilmesi genel olarak gereksizdir. Fakat bazı durumlarda örneğin test maddesinin asidik orman toprağında bulunması durumunda veya elektrostatik olarak yüklü kimyasallar için, ek toprak çeşitleri kullanmak gerekli olabilir.

1.6.3. Toprak örneklerinin toplanması ve depolanması

1.6.3.1. Toplama

Toprak örneklerinin toplama alanlarının geçmişi hakkında detaylı bilgiler mevcut olmalıdır. Bilgilerde kesin olarak toplama yerleri, yerin bitki örtüsü, bitki koruma ürünleriyle muamele edildiği tarihleri, organik ve anorganik gübrelerle muamele edildiği tarihleri ve biyolojik malzemelerin eklenmesi veya kazara meydana gelen kirlenme durumları belirtilir. Toprak toplanması icin seçilen alan uzun vadede kullanılabilir olmalı. Sonsuz otlaklar, yıllık tahıl tohumları içeren alanlar (mısır hariç) veya yoğun yeşil ekili gübreli alanlar uygundur. Toplama için seçilen alanın bir yıl öncesinden bitki koruma ürünlerine maruz kalmamış olması gerekir. Aynı zamanda herhangi bir organik gübrenin toplama işleminden altı ay önce toprağa etki etmemiş olması gerekir. Mineral gübre kullanımından üç ay sonra toplama yapılabilir. Biyolojik etkileri (örneğin kalsiyum siyanamit) olan gübrelerin kullanıldığı alanlardan toprak toplanması sakıncalıdır.

Örnek toplama işlemi kuraklık (30 günden fazla) ve suyla tomruk taşınım durumlarında yapılmamalıdır. Sürülmüş topraklardan örnekler 0 ile 20 cm' lik derinliklerden alınmalıdır. Uzun zamandır sürülmemiş topraklardan ise örnekler yerin 20 cm' den biraz daha fazla

derinlikten alınmalıdır (25 cm' ye kadar). Toprak örnekleri uygun kaplarda ve toprağın özelliğini bozmayacak sıcaklıkta taşınmalıdır.

1.6.3.2. Depolama

Alandan yeni toplanmış topraklar tercih edilir. Laboratuvarda depolanması kaçınılmazsa 4±2 °C' de karanlıkta maksimum üç ay depolanabilir. Depolama esnasında aerobik koşullar sağlanmalıdır. Eğer toprak örnekleri en az üç yıl boyunca donmuş olarak bulundukları bir yerden toplanmışsalar -18 derecede 6 ay boyunca depolanabilirler. Depolanan toprakların mikrobiyal biyolojik kütlesi her deneyden önce ölçülür ve biyolojik kütledeki karbon, toplam toprak organik karbon içeriğinin %1'i olmalıdır (Bakınız bölüm 1.6.2).

1.6.4. Test için toprağın elleçlenmesi ve hazırlanması

1.6.4.1. Ön inkübasyon

Toprak depolanmışsa (Bakınız bölüm 1.6.4.2 ve 1.7.1.3) 2 ile 28 gün arasında ön inkübasyon gerekir. inkübasyon esnasında toprağın sıcaklığı ve nem içeriği testte kullanılan nem ve sıcaklık ile aynı olmalıdır (Bakınız bölüm 1.6.4.2 ve 1.7.1.3).

1.6.4.2. Fiziksel – Kimyasal özellikler

Topraktan elle büyük parçacıklar (taş, bitki parçaları vb.) ayrılır ve elekten geçirilir böylece 2 mm' den büyük partikül içermez. Toprağın nem oranı, %40 ve % 60' lık maksimum su tutma kapasitesini geçmeyecek şekilde saf veya iyonu giderilmiş su ile ayarlanmalıdır.

1.6.5. Toprağa uygulanacak olan test maddesinin hazırlanışı

Test maddeleri genellikle bir taşıyıcı kullanılarak toprağa uygulanır. Uygun taşıyıcı su olabilir veya kuartz toprağı gibi (partikül boyutu: 0,1-0,5 mm) etkisiz bir katı olabilir. Su dışındaki sıvı taşıyıcılar tercih edilmemelidir çünkü mikrofloraya zarar verebilir. Taşıyıcı olarak kum kullanılırsa uygun çözücüde çözünmüş veya dağılmış test maddesi ile kaplanabilir. Böyle durumlarda çözücü toprağa karışmadan buharlaştırılarak uzaklaştırılmalıdır. Test maddesinin toprakta optimum yayılımı için 10 g kum/1 kg (kuru ağırlık) toprak oranı önerilir.

Uçucu kimyasallar test edildiğinde madde kaybı engellenmeli ve toprakla homojen bir dağılım elde edilmelidir (örneğin test maddesi farklı bölgelerden toprağa enjekte edilmelidir).

1.6.6. Test derişimleri

Eğer bitki koruma ürünleri veya başka kimyasalların tahmini çevresel konsantrasyonları test ediliyorsa en az 2 tane konsantrasyon kullanılmalıdır. Düşük konsantrasyon elverişli koşullarda toprağa ulaşacak maksimum miktarı yansıtırken; yüksek konsantrasyon düşük konsantrasyonun birkaç katı olmalıdır. Toprağa eklenen test maddesinin konsantrasyonu 5 cm'lik bir derinlik ve 1.5 toprak yoğunluğuna uygun olarak hesaplanır. Toprağa doğrudan uygulanan tarımsal kimyasallar veya toprağa ulaşan miktarlar önerilen test konsantrasyonu Tahmini Çevresel Konsantrasyondur (Predictable Environmental Concentration, PEC) ve bu konsantrasyonun 5 katıdır. Toprağa bir sezonda çeşitli zamanlarda uygulanması umulan maddeler umulan en yüksek uygulama sayısı ile PEC çarpılarak elde edilmiş konsantrasyonda

test edilmelidir. Test edilen yüksek konsantrasyon maksimum tek uygulama oranının 10 katını geçmemelidir.

Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa en az beş tane konsantrasyon kullanılmaktadır. Bu test derişimleri ECx değerlerini bulmaya yönelik aralığı kapsamalıdırlar.

1.7. Testin performansı

1.7.1. Maruz kalma koşulları

1.7.1.1. İşlem ve kontrol

Tarımsal kimyasallar test ediliyorsa toprak üç eşit parçaya ayrılır. iki kısmı ürünü içeren taşıyıcı ile karıştırılırken, diğer kısmı ürün içermeyen taşıyıcı ile karıştırılır (kontrol). En az üçer tane hem işlemeden geçmiş hem de işleme tabi tutulmamış paralel toprak örneğine ihtiyaç vardır. Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa toprak altı eşit ağırlıklı parçaya bölünür. beş parçası test maddesi içeren taşıyıcı ile karıştırılırken altıncı parçası kimyasal içermeyen taşıyıcı ile karıştırılır. En az üçer tane hem işlemeden geçmiş hem de işleme tabi tutulmamış paralel toprak örneğine ihtiyaç vardır. İşlenmiş toprak örneklerinde test maddelerinin homojen dağılımına dikkat edilmelidir. Karıştırma esnasında, toprağı sıkıştırmadan veya yuvarlamadan kaçınılmalıdır.

1.7.1.2. Toprak örneklerinin inkübasyonu

Toprak örneklerinin inkübasyonu iki yolla yapılır: birincisi işlemden geçmiş ve işlemden geçmemiş toprağın yığın halinde örnekleriyle veya işlemden geçmiş ve işlemden geçmemiş her biri eşit boyuta ayrılmış küçük toprak örnekleri halinde inkübasyon yapılır. Uçucu örneklerin testindeyse, seri halindeki ayrı ayrı örneklerle yapılmalıdır. Topraklar yığın halinde inkübasyon yapıldığında, işlenmiş ve işlenmemiş toprakların büyük miktarları hazırlanır ve test esnasında analiz etmek için gerektikçe küçük örnekler alınır. Her işlem ve kontrol için ilk başta hazırlanan miktar, küçük miktardaki örneklerin boyutuna, analizlerde kullanılan benzer küçük örneklerin sayısına ve umulan en fazla örnekleme zamanı sayılarına bağlıdır. Yığın halinde inkübasyon yapılan toprak küçük örnekler alınmadan önce tamamen karıştırılmalıdır. Topraklar tek tek seriler halinde inkübasyon yapıldığında, her işlemden geçmiş ve geçmemiş yığın örnek gerektiği kadar küçük örnek gruplarına bölünür ve bunlar gerektiği şekilde kullanılır. Deneylerde iki örnekleme zamanından daha fazlası beklendiğinde, bütün tekrarlar ve örnekleme zamanları için yeterli miktarda küçük örnek hazırlanmalıdır. Test toprağının en az üç eş örneği, aerobik koşullarda inkübasyon yapılmalıdır (Bakınız bölüm 1.7.1.1). Bütün testler esnasında, aerobik olmayan koşulların oluşmasından kaçınmak için yeterli kafa boşluğu olan uygun şişeler kullanılmalıdır. Uçu maddeler test edilirken, test yanlızca küçük örnekler halindeki seriler ile yürütülmelidir.

1.7.1.3. Test koşulları ve süresi

Test oda koşullarında 20±2 °C' de karanlıkta uygulanır. Toprağın nem oranı, test esnasında %40 ve % 60'lık maksimum su tutma kapasitesi aralığında geçmeyecek şekilde %±5 aralığında korunmalıdır. Saf su veya iyonu giderilmiş su gerektiğinde eklenebilir.
Bütün testler en az 28 gün sürer. Eğer tarımsal kimyasallar test ediliyorsa açığa çıkan karbondioksit miktarlarıyla tüketilen oksijen miktarları işlemden geçen ile kontrol toprak örnekleri arasında kıyaslanır. Ama 28. günün sonunda işlemden geçirilen toprak ile işleme

tabi tutulmayan toprak (kontrol) arasındaki fark yok veya farkı %25' ten fazlaysa ölçümlere maksimum 100 güne kadar devam edilir. Eğer tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa, test maddesinden farklı derişimlerde toprak örneğine eklenir, 28 inci günde işlemden geçirilen toprak ile işleme tabi tutulmayan topraktan (kontrol) açığa çıkan karbondioksit miktarı veya tüketilen oksijen miktarı ölçülür. Ardından EC_x değerleri hesaplanır.

1.7.2. Toprağın seçimi ve analizi

1.7.2.1. Toprak örnekleme planı

Tarımsal kimyasallar test ediliyorsa 0., 7., 14., ve 28., günlerde toprak glikoz varlığında teneffüs için analiz edilir. Eğer daha uzun bir test gerekiyorsa 28 günden sonra 14 günlük aralıklar ile daha sonraki ölçümler yapılmalıdır.

Eğer tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar test ediliyorsa en az 5 test konsantrasyonu kullanılır ve başında (0. gün) ve maruz kalma periyodunun sonunda (28. gün) toprak örnekleri glikoz varlığında solunum için analiz edilir. Gerekli görüldüğü takdirde ara günlerin birisinde (örneğin 7. günde) bir ölçüm daha yapılabilir. 28. günde elde edilen verilerle kimyasal için ECx değerleri hesaplanabilinir. İstendiği takdirde 0. günden elde edilen veriler doğrultusunda topraktaki mikrobiyal biyokütlesinin başlangıçtaki miktarı hesaplanabilinir (12).

1.7.2.2. Glikoz varlığında teneffüs hızının ölçülmesi

İşlemden geçen ve geçmeyen toprak örnekleri için *glikoz varlığında solunum hızı* her örnekleme zamanı için elde edilir. Bu işlem için gerekli glikoz miktarının belirlenmesi için bir dizi glikoz konsantrasyonu kullanılarak bir ön test yapılabilir (14). Fakat % 0.5-1.5 organik karbon içeren kumlu topraklar için 2000-4000 mg glikoz/ kg kuru toprak ağırlığı oranı çoğunlukla yeterlidir. Glikoz temiz kuartz kumu ile dövülerek toz haline getirilir ve homojen şekilde toprak ile karıştırılır.

20±2 derecede solunum oranı, glikozla karıştırılmış toprağın uygun bir cihaz ile her saatte bir veya iki saatte bir ölçülmesiyle hesaplanır. Salınan karbondioksit veya tüketilen oksijen miktarı 12 saat süresince ölçülür ve ölçümler mümkün olduğunca çabuk, glikoz ilavesinden hemen sonra 1 – 2 saat içerisinde başlamalıdır. 12 saat süresince toplam salınan karbon dioksit miktarı veya tüketilen oksijen ölçülür ve ortalamasolunum hızı hesaplanır.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların işlenmesi

Tarımsal kimyasalların testi söz konusuysa; açığa çıkan karbondioksit miktarı veya harcanan oksijen miktarı her toprak örneği için ayrı ayrı hesaplanmalı ve ortalama değeri bulunarak tablo hazırlanmalıdır. Sonuçlar uygun ve genel olarak kabul edilen istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmelidir (örneğin F-testi, %5 değer seviyesinde).*glikoz varlığında teneffüs hızı* mg karbon dioksit/kg kuru toprak ağırlığı/saat veya mg oksijen/kg toprak ağırlığı/saat şeklinde ifade edilir. Her işlemde açığa çıkan karbondioksit miktarı veya harcanan oksijen oranı teste

tabi tutulmayan toprak örneğiyle (kontrol ile) kıyaslanır ve kontrolden yüzde sapma hesaplanır.

Eğer test tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasallar için yapılıyorsa, her tekrar vasıtasıyla açığa çıkan karbondioksit miktarı veya harcanan oksijen miktarı belirlenir EC_x değerlerinin hesaplanması için doz-cevap eğrisi çizilir. 28. günün sonunda işlemden geçmiş örneklerden bulunan *glikoz varlığında teneffüs hızları* (örneğin mg karbon dioksit/kg kuru toprak ağırlığı/saat veya mg oksijen/kg toprak ağırlığı/saat olarak) ile teste tabi tutulmayan toprak örneği (kontrol) kıyaslanır. Bu veriler doğrultusunda her test konsantrasyonu için % engelleme değerleri hesaplanır. İstatistiksel prosedürler kullanılarak bu yüzdelere karşı derişim grafiğinden EC_x değerlerine ulaşılır. Aynı zamanda hesaplanmış EC_x için standart prosedürler kullanılarak güven aralıklarıda belirlenir (15)(16)(17).

2.2. Sonuçların yorumlanması

Tarımsal kimyasalların test sonuçları değerlendirildiğinde daha düşük muamele (örneğin maksimum tahmin edilen konsantrasyon) ile kontrol teneffüs oranları arasındaki fark 28 gün sonundaki herhangi bir örnekleme zamanında birbirine eşit veya %25 ten az ise ürün toprakta uzun vadede karbon dönüşümüne etkisi olmayan bir ürün olarak değerlendirilir. Tarımsal kimyasallar dışındaki kimyasalların kullanımından elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde EC_{50} EC_{25} ve /veya EC_{10} değerleri kullanılır.

3. RAPORLAMA

Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir.

Kullanılan toprağın eksiksiz tanımıyla birlikte aşağıdakileri içerir,

- bölgenin coğrafi referansı (enlem, boylam);
- alanın geçmişi hakkında bilgi (örneğin bitki örtüsü, mahsül koruma ürünleri ile muamelesi, gübrelerler muamele, kazara gerçekleşen kirlilikler, vs.);
- kullanım tipi (örn., tarımsal toprak, orman vb)
- örneğin çıkarıldığı derinlik (cm);
- kum/ alüvyon/kil içeriği (% kuru ağırlık);
- pH (suda);
- organik karbon içeriği (% kuru ağırlık);
- azot içeriği (% kuru ağırlık);
- katyon değişim kapasitesi (mmol/kg);
- toplam organik karbon yüzdesi şeklinde ilk baştaki mikrobiyal biyolojik kütle;
- her parametrenin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin referansı;
- toprak örnekleriyle ilgili tüm toplama ve depolama bilgileri;
- eğer varsa ön inkübasyon detayları;

Test maddesi:

- fiziksel durumu, gerektiğinde, fiziksel-kimyasal özellikleri;
- kimyasal tanımlama verileri, gerektiğinde, yapısal formülü, saflığı (örneğin bitki koruma ürünleri için aktif içeriğin yüzdesi , azot içeriği.

Test koşulları:

- toprağın organik substratla ıslahının ayrıntıları;
- kullanılan test kimyasallarının konsantrasyon sayısı, uygun olduğunda, seçilen konsantrasyonların haklı gerekçeleri;
- test maddesinin toprağa uygulanmasının ayrıntıları;
- inkübasyon sıcaklığı;
- toprağın başlangıçtaki ve test süresince nem oranı;
- kullanılan toprak inkübasyon yöntemi (örneğin yığın olarak veya küçük örnek serileri halinde);
- tekrar sayısı
- örnekleme zamanları.

Sonuçlar :

- havalanma hızı hesaplanmasında kullanılan yöntem ve donanım;
- her biri için ve ortalama karbondioksit veya oksijen miktarını içeren tablo halindeki veriler;
- işlemden geçen ve işleme tabii tutulmayan örnek (kontrol) arasındaki değişiklik;
- anlamlı ise, hesaplamalarda yapılan düzeltmelerin açıklaması;
- her örnekleme zamanındaki glikoz varlığında havalandırma oranlarındaki yüzde değişim, eğer uygunsa, % 95 güven ağırlığıyla birlikte EC_{50}, diğer EC_x değerleri güven aralıkları ile birlikte ve doz-cevap eğrisinin grafiği;
- uygun olduğunda, sonuçlara uygulanan istatistiksel işlemler;
- sonuçların yorumlanmasında yardımcı olabilecek tüm bilgi ve gözlemler.

4. KAYNAKLAR

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy,18-20 January 1995.

(6) TS ISO 10381-6 Toprak Kalitesi-Numune Alma Bölüm 6-Toprakların Aerobik Mikrobiyal Faaliyetlerinin Laboratuvar Şartlarında Değerlendirilmesi İçin Numune Alma, Taşıma ve Muhafaza Kuralları

(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) TS ISO 11266-1. Toprak Kalitesi-Aerobik Şartlar Altındaki Toprakta Organik Kimyasal Maddelerin Biyolojik Parçalanabilirliği ile İlgili Laboratuvar Deneyleri Kılavuzu
(10) TS ISO 14239 Toprak Kalitesi- Toprakta Aerobit Şartlarda Organik Kimyasal Maddelerin Parçalanmasının Ölçülmesi İçin Lâboratuvar Kuluçka Sistemleri
(11) Heinemeye,r 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) TS ISO 14240-1 Toprak Kalitesi- Toprak Mikrobiyal Biyokütlesi Tayini- Bölüm 1: Substratla Hızladırılmış Solunum Metodu
(13) TS ISO 14240-2 Toprak Kalitesi- Toprak Mikrobiyal Biyokütlesi Tayini- Tütsüleme Özütleme Metodu
(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.
(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
(16) Finney,D.J. (1971). Probit Analysis.3rd ed., Cambridge,London and New-York.
(17) Finney D.J. (1978).Statistical Methods in biological Assay.Griffin,Weycombe, UK.

C.23 TOPRAK İÇİNDE AEROBİK VE ANAEROBİK DÖNÜŞÜM

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 307 (2002) ile eşdeğerdir.

1.1. Giriş

Bu yöntemde var olan yönergeler (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) temel alınmıştır. Bu test yönteminde bahsedilen yöntem, topraktaki kimyasalların aerobik ve aerobik olmayan dönüşümlerini değerlendirmek için geliştirilmiştir. Deneyler (i) test maddesinin dönüşüm oranını (ii) bitki ve toprak organizmalarının maruz kalabileceği oluşumların tabiatını, oranlarını ve dönüşüm ürünlerindeki azalmayı, belirlemek için yapılır. Toprağa doğrudan uygulanan ve toprak ortamına ulaşma eğilimdeki kimyasallar için bu tür çalışmalar gereklidir. Bu tür laboratuar çalışmalarının sonuçları, ilgili alan çalışmaları için örnekleme ve analiz protokollerinin geliştirilmesi içinde kullanılabilir.

Dönüşüm yollarının (8)(10)(11) değerlendirilmesi için bir toprak tipiyle yapılan aerobik ve aerobik olmayan çalışmalar genel olarak yeterlidir. Dönüşüm oranı (8)(10) ek olarak en az üç toprak örneğiyle belirlenmelidir.

1995 yılında İtalyanın Belgirate şehrinde yapılan Toprak/Tortu seçimi ile ilgili bir OECD uygulamalı seminerinde (10), bu testte kullanılan toprağın bilhassa tipi ve sayısı üzerinde mutabakata varılmıştır. Test edilen toprak tipi kullanımın veya salınımın olacağı yerdeki çevresel koşulları temsil etmelidir. Örneğin, astropikal' den tropikala kadar olan iklimlerde salınabilecek kimyasallar, Ferrasoller veya Nitosoller (FAO sistemi) ile test edilmelidir. Bu uygulamalı seminer ayrıca, ISO yönergesini (15) temel alarak, toprak örneklerinin toplanması, kullanımı ve depolanması ile ilgili tavsiyelerde de bulunmuştur. Çeltik tarlası (pirinç) topraklarının kullanımı da bu yöntemde dikkate alınmıştır.

1.2. Tanımlar ve birimler

Test maddesi: Ana madde veya ana maddenin dönüşümü sonucu açığa çıkacak herhangi bir madde.

Dönüşüm ürünleri: CO_2 ve bağlı kalıntıları da içeren test maddesinin biyotik ve abiyotik dönüşüm reaksiyonlarından elde edilen tüm maddeler.

Bağlı kalıntılar: "Bağlı kalıntılar" ekstraksiyon sonrası toprak, bitki veya hayvanda, ana madde ve metabolit şeklinde matriks içinde kalmakta ısrar eden maddeleri temsil eder. Ekstraksiyon metodu bileşikleri ve matriksin yapısını büyük ölçüde değiştirmemelidir. Bağın doğası matriks-değişim ekstraksiyonu ve gelişmiş analitik metotlar ile aydınlatılabilir. Bugüne kadar, örneğin, kovalent, iyonik ve tutucu bağlar gibi bağlanma şekilleri bu yolla tanımlanmıştır. Genel olarak, bağlı artıkların oluşumu biyolojik erişilirliği ve biyolojik kullanılabilirliği belirgin bir biçimde azaltır (12) [IUPAC 1984 (13) 'den değiştirilerek] .

Aerobik dönüşüm: Moleküler oksijen varlığında gerçekleşen reaksiyonlar (14).

Anaerobik dönüşüm: Moleküler oksijen olmadan gerçekleşen reaksiyonlar (14).

Toprak: Mineral ve organik kimyasal bileşenlerin bir karışımı, ve son olarak yüksek karbon ve azot içerikli ve yüksek molekül kütlesine sahip bileşikler içeren, küçük organizmalar (çoğunlukla mikro) tarafından canlılık katılmış bir karışımdır. Toprak, testlerde iki halde kullanılabilir:

(a) karıştırılmamış (işlenmemiş), zaman içinde geliştirilmiş, çeşitli tipteki toprakların karakteristik tabakaları halinde;
(b) karıştırılmış(işlenmiş), daha çok tarıma elverişli alanlarda bulunan veya kazma ile kazılarak alınan ve bu test yönteminde kullanılan örneklerde gerçekleşir (14).

Mineralleşme: Aerobik koşullarda bir organik bileşiğin tamamen CO_2 ve H_2O' ya ve aerobik olmayan koşullarda tamamen CH_4, CO_2 ve H_2O' ya bozunmasıdır. Bu test metodunun içeriğinde, ^{14}C-işaretlenmiş bileşik kullanıldığında, mineralleşme, uygun miktarda $^{14}CO_2$ salınımı ile işaretlenmiş karbon atomu yükseltgenirken, molekülün büyük oranda bozunması anlamına gelir (14).

Yarı Ömür: $t_{0,5}$, dönüşüm, birinci dereceden kinetik ile tanımlandığında (konsantrasyondan bağımsız), test maddesinin %50 dönüşümü için geçen zamandır.

DT_{50} (Kaybolma zamanı 50): Test maddesinin ilk derişiminin %50 oranında azaltılması içinde geçen zamandır. Dönüşüm birinci dereceden kinetik üzerinden yürümüyorsa, yarı ömür $t_{0,5}$ 'den farklıdır.

DT_{75} (Kaybolma zamanı 75): Test maddesinin ilk derişiminin %75 oranında azaltılması içinde geçen zamandır.

DT_{90} (Kaybolma zamanı 90): Test maddesinin ilk derişiminin %90 oranında azaltılması içinde geçen zamandır.

1.3. Referans maddeler

Referans maddeleri dönüşüm ürünlerinin spektroskopik ve kromatografik olarak belirlenmesi ve/veya tanımlanması için kullanılmalıdır.

1.4. Yöntemin uygulanabilirliği

Yöntem genelde yeterli doğruluk ve hassasiyete sahip analitik metotların varlığında kimyasal maddelere (işaretlenmemiş veya radyoaktif olarak işaretlenmiş) uygulanabilir. Az miktarda uçucu, uçucu olmayan, suda çözünebilir veya suda çözünmeyen bileşikler içinde uygulanabilir.

Bu test şartlarında toprakta tutulamayan, çok uçucu kimyasallar (dezenfektant, organik çözücü, vb.) için bu test uygulanmamalıdır.

1.5. Test maddesi ile ilgili bilgi

İşaretlenmemiş veya işaretlenmiş test maddesi, dönüşüm oranını ölçmek için kullanılabilir. İşaretlenmiş madde kullanımı, dönüşümün yollarını belirlemek ve kütle denkliği kurabilmek için gereklidir. ^{14}C ile işaretleme tavsiye edilir, fakat ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P gibi diğer izotopların

kullanımı da faydalı olabilir. İşaretleme, mümkün oldukça molekülün[1] en kararlı kısmına veya kısımlarına yerleştirilmelidir[1]. Test maddesinin saflığı en az %95 olmalıdır.

Topraktaki aerobik ve anaerobik dönüşüm ile ilgili bir test gerçekleştirmeden önce, Test maddesi ile ilgili aşağıdaki bilgiler mevcut olmalıdır:

(a) sudaki çözünürlük (Yöntem A.6);
(b) Organik çözücülerdeki çözünürlük;
(c) Buhar basıncı (Yöntem A.4) ve Henry yasası sabiti;
(d) n-oktanol/su dağılma katsayısı (Yöntem A.8);
(e) karanlıktaki kimyasal kararlılığı (hidroliz) (Yöntem C.7);
(f) pK_a, eğer molekül protonlanmaya ve proton vermeye eğilimli ise [OECD yönergesi 112] (16);

Diğer faydalı bilgiler test maddesinin toprak içindeki mikro organizmalar üzerindeki toksisitesi hakkında verileri içerebilir [Test yöntemleri C.21 ve C.22] (16).

Test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için analitik metotlar (ekstraksiyon ve temizleme metotlarını içeren) mevcut olmalıdır.

1.6. Test yönteminin ilkesi

Toprak örnekleri, kontrollü laboratuar koşulları altında (sabit sıcaklıkta ve toprak neminde), karanlıkta biyometre-tip kaplar içinde veya akış yollu sistemlerde, test maddesi ile muamele edilir ve inkübasyon yapılır. Uygun zaman aralıklarından sonra, toprak örnekleri ana madde ve dönüşüm ürünleri için analiz edilir. Uçucu ürünler de uygun soğurma cihazları ile analiz için toplanır. ^{14}C ile işaretlenmiş madde kullanarak, test maddesinin çeşitli mineralleşme oranları, açığa çıkan $^{14}CO_2$ tuzaklanarak ölçülebilir ve bir kütle dengesi, toprağa bağlı kalıntıları içerecek şekilde kurulabilir.

1.7. Kalite kriterleri

1.7.1. Geri kazanım

En az bir çift toprak örneğine test maddesinin hemen katılmasından sonra yapılan ekstraksiyon ve analiz, analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin ilk belirtisini ve test maddesi için uygulama işleminin aynılığını gösterir. Deneyin daha sonraki bölümleri için geri kazanım ilgili kütle denkliği ile verilir. Geri kazanımlar, işaretlenmiş kimyasallar için %90 ile %110 aralığında (8), işaretlenmemiş kimyasallar için %70 ile %110 arasında olmalıdır (3).

1.7.2. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti

Test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin miktarını belirlemek için kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği (ilk ekstraksiyon verimliliğini hariç tutarak) dönüşüm ürünlerinin oluşumu için yeterince uzun inkübasyon yapılmış aynı toprak ekstrakt örneğinin ikinci kez analizi ile kontrol edilebilir.

[1]Örneğin test maddesi sadece bir tane halka içeriyorsa, işaretlemenin bu halka üzerinde olması gerekir; eğer test maddesi bir veya daha fazla halka içeriyorsa, dönüşüm ürünlerinin oluşumu ile ilgili daha uygun bilgiler elde etmek için her işaretlenmiş halkanın akıbeti ile ilgili farklı çalışmalara gerek olabilir.

Test maddesi ve dönüşüm ürünleri için analitik yöntemin tayin sınırı (Limit of Detection, LOD) 0,01 $mg.kg^{-1}$ toprak (test numunesi) veya test sistemine daha düşük miktarda uygulanan ilk miktarın en az % 1' i kadar olmalıdır. Ek olarak, miktar belirleme limiti (Limit of Quantification, LOQ)' de belirtilmelidir.

1.7.3. Dönüşüm verilerinin doğruluğu

Test maddesi derişimine, zamanın bir fonksiyonu olarak uygulanan regresyon analizi, dönüşüm eğrisinin doğruluğu üzerinde uygun bilgiler verir ve yarı ömürler (eğer sahte (pseudo) birinci-dereceden kinetik uygulanırsa) veya DT_{50} değerleri ve eğer uygunsa, DT_{75} ve DT_{90} değerleri için güvenlik aralığı hesaplamasına imkan verir.

1.8. Test yönteminin tanımlanması

1.8.1. Donanım ve kimyasal reaktifler

Inkübasyon sistemleri statik kapalı veya uygun akış yollu sistemlerden oluşur (7)(17). Uygun akış yollu toprak inkübasyon aygıtı ve biyometre-tip kap sırasıyla Ek-III Şekil 1 ve 2' de gösterilmiştir. Her iki inkübasyon sisteminde bazı avantajları ve sınırlandırmaları vardır (7)(17).

Özellikle gerekli olan laboratuar donanımı aşağıdaki gibidir:
- radyoaktif olarak işaretlenmiş veya işaretlenmemiş maddelerin analizi için uygun algılama sistemlerini içeren GLC, HPLC, TLC-donanımı gibi analitik cihazlar veya ters izotop seyreltme yöntemi;
- tanımlama amaçlı cihazlar (Örneğin, MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, vs.)
- sıvı sintilasyon sayacı;
- radyoaktif maddelerin yanması için oksitleyici (yükseltgeyici)
- santrifüj;
- ekstraksiyon düzeneği (örneğin, soğuk ekstraksiyon için santrifüj tüpleri ve geri soğutucu altında sürekli ekstraksiyon için sokslet düzeneği);
- çözeltileri ve ekstraktları deriştirmek için gerekli cihazlar (örneğin döner buharlaştırıcı);
- su banyosu;
- mekanik karıştırma cihazı (örneğin, yoğurma makinası, döner karıştırıcı).

Kullanılan kimyasallara örnek olarak:
- NaOH, analitik saflıkta, 2 mol.dm-3, veya diğer uygun bazlar (örneğin, KOH, etanolamin);
- H2SO4, analitik saflıkta, 0,05 mol.dm-3;
- etilen glikol, analitik saflıkta;
- katı soğurucu (absorpsiyon) sistemleri, örneğin, sönmemiş kireç (soda lime) ve poliüretan tıpalar;
- organik çözücüler, analitik saflıkta, örneğin, aseton, metanol, vs.;
- sintilasyon sıvısı.

1.8.2. Test maddesi uygulaması

Toprağa ekleme ve karıştırma için test maddesi su (iyonu giderilmiş veya damıtılmış) içinde veya gerektiğinde, test maddesinin yeterli derecede çözünmesi ve kararlı olarak kalması için minimum miktarda aseton veya diğer organik çözücüler (6) içinde çözülebilir. Ama, seçilen

çözücü miktarının, toprağın mikrobiyal aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi olmamalıdır (Bakınız bölüm 1.5 ve 1.9.2-1.9.3). Mikrobiyal aktiviteyi azaltan kloroform, diklorometan ve diğer halojen içeren çözücülerin kullanımından kaçınılmalıdır.
Test maddesi, örneğin kuartz kum (6) içinde veya küçük örnek gurupları halindeki hava ile kurutulmuş ve sterilize edilmiş test toprağı içinde karıştırılarak katı olarak da eklenebilir. Eğer test maddesi çözücü kullanılarak eklenirse, steril olmayan orijinal toprak örneğine çözücü içeren bu küçük örnek eklenmeden önce, çözücünün uçmasına izin verilmelidir.

Genel kimyasallar için toprağa ulaşmanın önemli yolu lağım çamuru/tarımsal uygulamalarıdır, test maddesi ilk olarak çamura eklenir, daha sonra toprak örneğiyle karıştırılmalıdır. (Bakınız bölüm 1.9.2 ve 1.9.3).
Formülasyon ürünlerinin kullanımı rutin olarak tavsiye edilmez. Fakat örneğin az çözünür test maddeleri için, formülasyon maddelerin kullanımı uygun bir alternatif olabilir.

1.8.3. Topraklar

1.8.3.1. Toprak seçimi

Dönüşüm yolunu belirlemek için, alındığı bölgeyi temsil eden bir toprak kullanılabilir; pH' sı 5,5-8,0, organik karbon içeriği %0,5-2,5 ve mikrobiyal biyolojik kütlesi toplam organik içeriğinin en az %1' i olan, kumlu kil, tortulu kil, kil veya killi toprak [FAO ve USDA sınıflandırmasına göre (18)] olması önerilir (10).
Dönüşüm oranı çalışmaları için ilgili toprağı temsil eden en az üç ek toprak örneği kullanılmalıdır. Topraklar organik karbon içeriklerine, pH' a, kil içeriğine ve mikrobiyal biyolojik kütleye göre çeşitlilik gösterebilir (10).

Bütün toprakların, en azından doku sınıflandırması (%kum, %alüvyon, %kil)[FAO ve USDA sınıflandırmasına göre (18)], pH, katyon değiştirme kapasitesi, organik karbon, yığın (bulk) yoğunluğu, su tutma kapasitesi[2] ve mikrobiyal biyolojik kütle (sadece aerobik çalışmalar için) için belirlenmesi yapılmalıdır. Sonuçları yorumlarken toprak özellikleri hakkında ek bilgiler kullanışlı olabilir. Toprak karakteristiklerinin[1] belirlenmesi için kaynaklardaki (19)(20)(21)(22)(23) gerekli yöntemler kullanılabilir. Mikrobiyal biyolojik kütle, substrat ile eyleme geçirilmiş solunum (substrate-induced respiration, SIR) yöntemi (25)(26) kullanılarak veya alternatif yöntemlerle belirlenebilir (20).

1.8.3.2. Toprakların toplanması, kullanımı ve depolanması

Test toprağının toplandığı bölge tarihi hakkında detaylı bilgi mevcut olmalıdır. Detaylar kesin yer, bitki örtüsü, kimyasallarla muamele, organik ve inorganik gübrelerle muamele, eklenmiş biyolojik maddeler ve diğer kirleticiler, gibi bilgileri içermelidir. Eğer topraklar önceki dört yıl içinde, test maddesi veya yapısal olarak benzerleriyle muamele edilmişse, bunlar dönüşüm çalışmaları için kullanılmamalıdır (10(15).
Toprak bölgeden, elemeyi kolaylaştıran toprak suyuyla beraber taze iken toplanmalıdır. Çeltik tarlaları dışında kalan toprak örnekleri için, uzun süreli (>30 gün) kuraklık, donma veya sel sonrasında hemen veya bu gibi durumlar esnasında örnekleme yapmaktan kaçınılmalıdır (14). Örnekler, toprak suyu içeriğinde minimum değişiklik olacak şekilde ve mümkün olduğunca

[1]Toprağın su tutma özelliği, alan kapasitesi, su tutma kapasitesi veya su emme gerilimi (pF) olarak ölçülebilir. Açıklama için EK-I' e bakınız. Su tutma özellikleri ve yığın yoğunluğu işlenmemiş alan örneklerinde veya işlenmiş alan örneklerinde belirlenmişse test raporunda rapor edilmelidir.

serbest hava girişine izin verecek şekilde karanlıkta taşınmalıdır. Bu amaç için gevşekçe bağlanmış polietilen bir torba genel olarak yeterlidir.

Toprak örneklemeden sonra olabildiğince çabuk işleme tabi tutulmalıdır. Bitkiler, geniş toprak faunaları ve taşlar, küçük taşları, faunayı ve bitki kırıntılarını ayıran, 2 mm' lik elekten geçirilmeden önce ayrılmalıdır. Elemeden önce fazla kurutma ve ezme işlemi yapmaktan kaçınılmalıdır (15).
Kışın, bölgede örnekleme yapmak zor olduğunda (toprak donmuş veya kar tabakası ile kaplı olduğunda), sera içinde bitki altından bir toprak yığını alınabilir (örneğin, çim veya çim-yonca karışımı). Bölgeden taze olarak toplanmış toprak ile yapılan çalışmalar şiddetle tercih edilir, fakat toplanan ve işlenen toprağın, çalışmanın başlangıcından önce depolanması gerekiyorsa, depolama koşulları, mikrobiyal aktiviteyi[1] koruyacak şekilde yeterli ve sınırlı bir zaman süresinde (maksimum üç ay için 4±2 °C) olmalıdır. Biyolojik dönüşüm deneylerinde kullanılacak olan toprağın toplanması, işlenmesi ve depolanması hakkında detaylı açıklamalar (8)(10)(15)(26)(27) içinde bulunabilir.

Test için işlenmiş toprağı kullanmadan önce, filizlenmeye, tohumların ayrılmasına ve örnekleme veya depolama koşullarıyla inkübasyon koşulları arasındaki işlemlerden kaynaklanan değişikliği takiben mikrobiyal metobolizma dengesinin yeniden kurulmasına olanak verecek şekilde, ön-inkübasyon yapılmalıdır. Gerçek testin sıcaklık ve nem koşullarında 2 ile 28 gün arası bir ön inkübasyon periyodu, genellikle yeterlidir.Depolama ve ön inkübasyon sürelerinin toplamı 3 ayı geçmemelidir.

1.9. Testin performansı

1.9.1. Test koşulları

1.9.1.1. Test sıcaklığı

Tüm test periyodu esnasında, test toprağı, kullanımın ve salınımın gerçekleştiği iklim koşullarını temsil edecek şekilde sabit sıcaklıkta ve karanlıkta inkübasyon yapılmalıdır. İklim sıcaklığında toprağa ulaşabilecek tüm test maddeleri için 20±2 °C' lik bir sıcaklık önerilir. Sıcaklık izlenmelidir.
Daha soğuk iklimlerde (örneğin, kuzey ülkelerinde, güz/kış periyotları esnasında) uygulanan veya salınan kimyasallar için, ek toprak örnekleri düşük sıcaklıkta (örneğin, 10±2 °C' de) inkübasyon yapılmalıdır.

1.9.1.2. Nem içeriği

Aerobik olmayan şartlar altındaki dönüşüm testleri için, toprak nem içeriği[2] pF 2,0 ve 2,5 olarak ayarlanmalı ve korunmalıdır (3). Toprak nem içeriği kuru toprak kütlesi başına su kütlesi olarak ifade edilir ve inkübasyon kapları düzenli olarak (örneğin, 2 haftalık aralıklar içinde) tartılarak kontrol edilir ayrıca su kaybı su eklenerek telafi edilir (tercihen steril-filtrelenmiş çeşme suyu ile). Nem ekleme esnasında, buharlaşma ve/veya ışınla bozunma

[1]Yakın zamanda yapılan çalışmalar ılıman bölge topraklarının da, mikrobiyal aktivitede belirgin düşüş olmaması için, üç aydan daha fazla sürelerde -20 °C' de depolanması gerektiğini işaret etmektedir.
[2]Toprağın yeterli havalandırma ve toprak mikrofulorasının beslenme koşullarını korumak için toprak ne çok ıslak ne de çok kuru olmalıdır. Nem içeriği, % 40-60 su tutma kapasitesi ve 0,1 – 0,33 bar aralığında, en uygun mikrobiyal büyüme için gereklidir. Daha sonraki aralık ise pf 2.0-2.5 aralığına eşdeğerdir. Farklı toprak tiplerine ait nem içerikleri Ek2' de verilmiştir. (6).

(eğer varsa) ile test maddesi ve dönüşüm ürünleri kaybını önlemek veya en aza indirgemek için ihtimam gösterilmelidir.
Aerobik olmayan ve çeltik tarlası gibi koşullar altında dönüşüm testlerinde toprak su baskını ile suyla doyurulur.

1.9.1.3. Aerobik inkübasyon koşulları

Akış yollu sistemlerde, aerobik koşullar, kesintili yıkama veya nemlendirilmiş hava ile sürekli havalandırarak sağlanacaktır. Biyometre kaplarında, hava değişimi difüzon vasıtasıyla sağlanır.

1.9.1.4. Steril aerobik koşullar

Bir test maddesinin Abiyotik dönüşümünün belirginliği ile ilgili bilgi elde etmek için, test toprak örnekleri bölüm 1.9.1.3' te açıklandığı gibi steril hale getirilebilir, (sterilizasyon yöntemleriları, bakınız kaynaklar 16 ve 29) steril test maddesi ile muamele edilebilir (steril filtreden çözeltinin eklenmesi gibi...)ve nemlendirilmiş steril hava ile havalandırılabilir. Çeltik tarlası toprakları için, toprak ve su, bölüm 1.9.1.6' da açıklandığı gibi steril hale getirilebilir ve inkübasyon yürütülebilir.

1.9.1.5. Aerobik olmayan inkübasyon koşulları

Aerobik olmayan koşulları oluşturmak ve korumak için, toprak test maddesi ile muamele edilir ve aerobik koşullar altında 30 gün boyunca inkübasyon yapılır veya bir yarı-ömür veya DT_{50} (hangisi kısa ise) daha sonra su ile doyurulur (1-3 cm su tabakası) ve inkübasyon sistemi reaktif olamayan bir gaz (örneğin, azot veya argon)[1] ile temizlenir. Test sistemi, pH, oksijen derişimi ve redoks potansiyeli gibi ölçümlere izin vermeli ve uçucu ürünler için tuzaklama aygıtları içermelidir. Biyometre-tip sistem difüzyon ile hava girişini engellemek için kapatılmalıdır.

1.9.1.6. Çeltik tarlası inkübasyon koşulları

Çeltik tarlası topraklarındaki dönüşümü çalışmak için, toprak 1-5 cm' lik su tabakası ile kaplanır ve test maddesi su fazına uygulanır (9). En az 5 cm' lik toprak derinliği önerilir.. Sistem aerobik koşullarda olduğu gibi hava ile havalandırılır. Sulu tabakanın pH' sı, oksijen derişimi ve redoks potansiyeli izlenmeli ve rapor edilmelidir. Dönüşüm çalışmalarına (Bakınız bölüm 1.8.3.2) başlamadan önce en az 2 haftalık ön inkübasyon periyodu gereklidir.

1.9.1.7. Test süresi

Oran ve seyir tarzı çalışmaları normal olarak 120 günü[2] geçmemelidir (3)(6)(8), çünkü daha sonra doğal ikmal yollarında izole edilmiş yapay bir laboratuar sisteminde toprak mikrobiyal aktivitesi üzerinde bir düşme umulabilir. Test maddesindeki azalmanın ve ana dönüşüm

[1]Avrupa sponsorluğundaki araştırmada [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden] gösterildiği gibi yüzeydeki veya yüzeye yakın topraklarda aerobik koşullar baskındır. Aerobik olmayan koşullar zaman zaman ağır yağmurlardan sonra toprağın su baskınına maruz kalmasıyla veya çeltik tarlası koşullarında ortaya çıkabilir.

[2] Aerobik çalışmalar, o anda en iyi dönüşüm yolunun ve mineralleşmenin elde edilmesi şartıyla 120 günden çok önce sonlandırılabilir.

ürünlerindeki oluşumun ve azalmanın karakterizasyonu gerekli olduğunda, çalışmalar daha uzun periyotlar halinde devam ettirilebilir (örneğin 6 veya 12 ay)(8). Daha uzun inkübasyon periyotlarının haklı gerekçeleri, periyotlar esnasında ve test sonundaki biyokütle ölçümleriyle beraber test raporunda belirtilmelidir.

1.9.2. Testin yürütülmesi

Yaklaşık 50 ile 200 g toprak (kuru ağırlık bazında) her inkübasyon kabına yerleştirilir (Bakınız Ek-III içindeki Şekil 1 ve2) ve toprak, bölüm 1.8.2' de bahsedilen yöntemlerden biri vasıtasıyla test maddesi ile muamele edilir. Test maddesinin uygulanması için organik çözücüler kullanıldığında, bunlar topraktan uçurularak ayrılmalıdır. Daha sonra toprak, bir spatül ile ve/veya kabın çalkalanmasıyla tamamen karıştırılır. Eğer çalışma çeltik tarlası koşulları altında yürütülüyorsa, toprak ve su test maddesi uygulandıktan sonra tamamen karıştırılmalıdır. Muamele edilmiş toprakların küçük miktarları, düzenli dağılımı kontrol etmek için test maddesi açısından analiz edilmelidir. Alternatif yöntem için aşağıya bakınız.

Muamele oranı, kullanılan talimatlarda gerekli görülen ve bölgedeki uygun derinliğe düzgün olarak dağıtılacak şekilde (örneğin, 10 cm' lik toprak tabakası[1] üstüne) ve mahsul koruma ürünlerindeki en yüksek uygulama oranlarına uygun olmalıdır. Örnek olarak, kimyasallar veya kimyasalla birleştirilmeksizin uygulanan toprakta, her kaba eklenmesi gereken kimyasalın hesaplanması için uygun derinlik, 2,5 cm' dir. Kimyasallarla birleştirilmiş topraklar için uygun derinlik, kullanılan talimatlarda belirtilen birleştirme derinliğine uygun olan derinliktir. Genel kimyasallar için uygulama oranı toprağa giriş şekline en uygun yol temel alınarak hesaplanabilir; örneğin, en önemli toprağa giriş yolunun lağım çamuru olduğu durumda, çamur içine, beklenen çamur derişimini yansıtacak şekilde, kimyasal dozu eklenmelidir ve toprağa eklenen çamur miktarı, tarımsal topraklara eklenen normal çamur yükleme miktarını yansıtacak şekilde olmalıdır. Eğer bu derişim ana dönüşüm ürünlerini tanımlamak için yeterli değilse, daha yüksek oranlar içiren ayrı toprak örneklerinin inkübasyonu yardımcı olabilir, fakat toprağın mikrobiyal aktivitesini etkileyen yüksek oranlardan kaçınılmalıdır (Bakınız bölüm 1.5 ve 1.8.2).

Alternatif olarak, daha toprağın daha geniş deney grupları test maddesi ile muamele edilebilir, uygun karıştırma makinesinde dikkatlice karıştırılır ve daha sonra 50' den 200' e kadarlık küçük bölümler halinde inkübasyon kaplarına transfer edilir (örneğin, örnek ayırıcılar kullanarak). Muamele edilmiş toprak gruplarının küçük miktarları, test maddesi açısından düzenli dağılımı kontrol etmek için analiz edilmelidir. Bu gibi bir prosedürün tercih edilmesinin sebebi, test maddesinin toprağın içinde düzenli bir şekilde dağılmasına imkan vermesidir.

---

[1] alan esasına göre ilk derişimin hesaplanması aşağıdaki eşitlik kullanılarak yapılır:

$$C_{toprak}\left[mg/kg_{toprak}\right] = \frac{A\left[kg/ha\right] - 10^6\left[mg/kg\right]}{1\left[m\right] - 10^4\left[m^2/ha\right] - d\left[kg_{toprak}/m^3\right]}$$

C_{toprak} = topraktaki ilk derişim [mg.kg^{-1}]

A = Uygulama oranı [kg.ha^{-1}]; l = alandaki toprak tabakasının kalınlığı [m]; d = toprağın kuru yığın yoğunluğu [kg.m^3].

Yaklaşık hesap kuralına göre,1 kg.ha^{-1} uygulama oranı, yaklaşık olarak 10 cm' lik tabakada 1 mg.kg^{-1} olarak sonuç verir (yığın yoğunluğunu 1 g.cm^3 kabul ederek).

Ek olarak muamele edilmemiş toprak örnekleri, örneklerde olduğu gibi aynı koşullar (aerobik) altında test maddesi ile inkübasyon yapılır. Bu örnekler test esnasında ve sonunda biyolojik kütle ölçümü için kullanılır.

Toprağa uygulanan test maddesi organik bir çözücü veya çözücüler içinde çözüldüğü zaman, aynı miktardaki çözücü veya çözücülerle muamele edilmiş toprak örnekleri, test maddesi ile muamele edilen örneklerde olduğu gibi, aynı koşullar altında (aerobik) inkübasyon yapılır. İlk önce biyolojik kütle ölçümleri için kullanılan bu örnekler, çözücülerin mikrobiyal biyolojik kütle içerisindeki etkilerini kontrol etmek için çalışmaların başında ve sonunda da kullanılır.
İşlem görmüş toprağı içeren kaplar ya şekil 1 de tanımlanan akış-yollu yada şekil 2 de (bakınız Ek-III) görülen absorpsiyon kolonu ile kapatılmış sisteme bağlanır.

1.9.3. Örnekleme ve ölçme

Farklı polaritedeki uygun çözücülerle ekstrakte edilen ve test maddesi ve/veya dönüşüm ürünleri açısından analiz edilen toprak örnekleri ve inkübasyon kapları uygun zaman aralıklarıyla çift olarak ayrılır. İyi tasarlanmış bir çalışma yeterince kap içermelidir, böylelikle her örnekleme işleminde iki kap feda edilebilir. Hatta, belirli zaman aralıklarında (ilk ayda 7 gün aralıklarla ve bir ay sonra 17 günlük aralıklarla) ve her toprak örneğinin inkübasyonu esnasında ve sonunda soğurma çözeltileri ve katı emme malzemeleri ayrılır ve uçucu maddeler için analiz edilir. Ayrıca, uygulamadan sonra doğrudan alınan bir toprak örneğinin yanında, en az 5 ek örnekleme noktasından alınmış toprak örneği de dahil edilmelidir. Test maddesindeki azalma şekli ve dönüşüm ürünlerinin oluşum ve azalma şekilleriyle seçilmesi gereken zaman aralıkları elde edilebilir (örneğin, 0, 1, 3, 7 gün; 2, 3, hafta; 1, 2, 3 ay, vs.).
^{14}C ile işaretlenmiş test maddesi kullanıldığında, ekstrakte edilemeyen radyoaktivite miktarı yanma ile belirlenmiş olacaktır ve her örnekleme aralığı için kütle dengesi hesaplanmış olacaktır.

Aerobik olmayan ve çeltik tarlası şartlarındaki inkübasyonda, toprak ve su fazları test maddesi ve dönüşüm ürünleri yönünden beraberce analiz edilir veya ekstraksiyon analizinden önce, süzme veya santrifüj ile ayrılır.

1.9.4. İsteğe bağlı testler

Aerobik, steril olmayan çalışmalarda, ek sıcaklıklar ve toprak nemi, test maddesinin ve/veya dönüşüm ürünlerinin dönüşüm oranlarına sıcaklığın ve toprak neminin etkisinin hesaplanması için kullanışlı olabilir.

Ekstrakte edilemeyen radyoaktivitenin ilave karakterizasyonuna örneğin, süperkritik akışkan ekstraksiyon kullanılarak teşebbüs edilebilir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Test maddesi, dönüşüm ürünleri, uçucu maddelerin miktarları ve ekstrakte edilemeyenlerin miktarı uygulanan ilk derişimin yüzdesi (%) ve her örnekleme aralığı için uygun olduğunda, $mg.kg^{-1}$ toprak (toprağın kuru ağırlığı esas alınarak) olarak verilmelidir. Kütle denkliği her örnekleme aralığı için uygulanan ilk derişimin yüzdesi şeklinde verilmelidir. Zaman karşı test maddesi derişiminin grafiksel gösterimi, dönüşümün yarı ömrü ve DT_{50}' sinin hesaplanmasına

imkan vermelidir. Ana dönüşüm ürünleri tanımlanmalı ve derişimleri de oluşum ve azalma oranlarını gösterecek şekilde zaman karşı çizilmelidir. Bir ana dönüşüm ürünü çalışma esnasındaki herhangi bir zamanda uygulana dozun %10' undan büyük veya eşit herhangi bir üründür.
Tuzaklanan uçucu ürünler, test maddesi ve topraktan gelen dönüşüm ürünlerinin uçuculuk potansiyelleri ile ilgili belirtiler verir.
Yarı ömür, DT_{50}, ve mümkünse DT_{75} ve DT_{90} değerlerinin daha doğru olarak belirlenmesi, uygun kinetik model hesaplamalarının uygulanması ile mümkündür. Yarı ömür ve DT_{50} değerleri, kullanılan modelin açıklaması, reaksiyon derecesi ve kararlılık katsayısı (r^2) ile beraber rapor edilmelidir. $r^2<0,7$ olmadıkça kinetik birinci derece lehindedir. Eğer uygunsa, hesaplamalar ana dönüşüm ürünlerinde uygulanmalıdır. Uygun modellerin örnekleri kaynaklar 31 ile 35 arasında açıklanmıştır.
Çeşitli sıcaklıklarda yürütülmekte olan hız çalışmaları esnasında, dönüşüm hızları, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak deneysel sıcaklık aralığı içinde Arrhenius bağıntısının aşağıdaki şekli kullanılarak açıklanabilir:

$$k=A.e^{-B/T} \text{ veya } lnk=lnA-(B/T),$$

Kesim noktasından ve eğimden elde edilen sırasıyla lnA ve B regresyon sabitleri lnk' nın 1/T' ye karşı doğrusal regresyonundan elde edilen en uygun doğru, k, T sıcaklığındaki hız sabiti ve T Kelvin cinsinden sıcaklık birimidir. Mikrobiyal işlem ile kontrol edilen durumda, Arrhenius bağıntısının geçerli olduğu sınırlı sıcaklık aralığında dikkatli olunmalıdır.

2.2. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Çalışmalar bir yapay laboratuar sisteminde yürütülmesine rağmen, sonuçlar bölgenin koşulları altında (36)(37), test maddesinin dönüşüm hızının ve hatta dönüşüm ürünlerinin oluşum ve azalmasının hesaplanmasına imkan verecektir.
Test maddesinin bir dönüşüm yolu çalışması uygulanan maddenin toprak içinde kimyasal ve mikrobiyal reaksiyonlarla yapısal olarak değişim şekli ile ilgili bilgi sağlar.

3. RAPORLAMA

Test raporu

Test raporu aşağıdakileri içermelidir:

Test maddesi:
- genel adı, kimyasal adı, CAS numarası, yapısal formülü (radyoaktif olarak işaretlenmiş malzeme kullanıldığında, işaretin veya işaretlerin yerini göstererek) ve ilgili fizikokimyasal özellikler; (Bakınız Bölüm 1.5)
- test maddesinin saflığı (safsızlıklar);
- işaretlenmiş kimyasalın radyokimyasal saflığı ve spesifik aktivitesi (uygun olduğunda)

Referans maddeler:
- dönüşüm ürünlerinin karakterizasyonu ve/veya tanımlanması için kullanılan referans maddelerinin kimyasal adı ve yapısı

Test toprakları:
- toplama bölgesinin detayları;
- toprak örneklemesinin tarihi ve prosedürü;

- toprakların özellikleri, örneğin pH, organik karbon içeriği, doku (% kum, %alüvyon, %kil), katyon değiştirme kapasitesi, yığın yoğunluğu, su tutma özellikleri ve mikrobiyal biyolojik kütle gibi;
- depolama süresi ve depolama koşulları (Eğer depolanmışsa);

Test koşulları;
- çalışmanın yürütüldüğü tarihler;
- uygulanan test maddesinin miktarı;
- test maddesi için kullanılan çözücüler ve uygulanan yöntem;
- analiz için, ilk başta ve her aralıktaki toprak ağırlığı;
- kullanılan inkübasyon sisteminin açıklaması;
- hava akış hızları (sadece akış yollu sistemler için);
- deneysel düzeneğin sıcaklığı;
- inkübasyon esnasında toprağın nem içeriği;
- Aerobik çalışmalar esnasında, başında ve sonundaki mikrobiyal biyolojik kütle;
- aerobik olmayan ve çeltik tarlasındaki çalışmalar esnasında, başında ve sonundaki pH, oksijen derişimi ve redoks potansiyeli;
- ekstraksiyon yöntemi veya yöntemleri;
- topraktaki ve soğurma malzemeleri içindeki test maddesinin ve ana dönüşüm ürünlerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için yöntemler;
- tekrar ve kontrol sayıları.

Sonuçlar:
- mikrobiyal aktivite belirlemesinin sonuçları;
- kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti;
- geri kazanım oranları (geçerli bir çalışma için % değerler bölüm 1.7.1' de verilir)
- uygulama ilk dozun yüzdesi şeklinde ve mümkün olduğunda $mg.kg^{-1}$ toprak (kuru ağırlı temel alınarak) şeklinde ifade edilen sonuçlar tablosu;
- çalışma esnasında ve sonundaki kütle dengesi;
- toprak içindeki ekstrakte edilemeyen (bağlı) radyoaktivite veya kalıntıların belirlenmesi;
- salınan CO_2' in ve diğer uçucu bileşiklerin miktarının belirlenmesi;
- test maddesi için ve mümkün olduğunda ana dönüşüm ürünleri için zaman karşı toprak derişimlerinin çizimi;
- test maddesi ve uygun olduğunda ana dönüşüm ürünleri için, güven aralıklarını da içeren, yarı ömür, DT_{50}, DT_{75} ve DT_{90} değerleri;
- steril koşullar altında abiyotik bozunma hızı hesaplaması;
- test maddesi ve uygun olduğunda ana dönüşüm ürünleri için dönüşüm kinetiklerinin değerlendirmesi;
- mümkün olduğunda dönüşümün önerilen mekanizması;
- ham veriler (örneğin örnek kromatogramlar, dönüşüm hızlarının ve dönüşüm ürünlerinin tanımlanması için kullanılan ortalamaların örnek hesaplamaları).

4. KAYNAKLAR

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
(6) TS ISO 11266 Toprak Kalitesi-Aerobik Şartlar Altındaki Toprakta Organik Kimyasal Maddelerin Biyolojik Parçalanabilirliği ile İlgili Laboratuvar Deneyleri Kılavuzu
(7) TS ISO 14239 Toprak Kalitesi- Toprakta Aerobit Şartlarda Organik Kimyasal Maddelerin Parçalanmasının Ölçülmesi İçin Lâboratuvar Kuluçka Sistemleri
(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
(9) MAFF - Japan 2000 - Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)
(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)
(15) TS ISO 10381-6 Toprak Kalitesi-Numune Alma Bölüm 6-Toprakların Aerobik Mikrobiyal Faaliyetlerinin Laboratuvar Şartlarında Değerlendirilmesi İçin Numune Alma, Taşıma ve Muhafaza Kuralları
(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC
(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) TS ISO 14240- Toprak Kalitesi- Toprak Mikrobiyal Biyokütlesi Tayini- Bölüm 1-2
(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.
(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).
(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).
(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.
(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.
(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.
(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.
(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 39, 188-204.
(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 33, 47-60.
(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.
(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

Ek-I

Su gerilimi, alan kapasitesi (fc) ve su tutma kapasitesi (whc)

Su kolonunun yüksekliği [cm]	pF(a)	Bar(b)	Açıklamalar
10^7	7	10^4	Kuru topraklar
$1,6x10^4$	4,2	16	Solma noktası
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6x10^2$	2,8	0,6	
$3,3x10^2$	2,5	0,33(c)	Alan kapasitesi aralığı(d)
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	Su tutma kapasitesi (tahmini)
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Su ile doyurulmuş toprak
1	0	0,001	

(a) pF = su kolonunun cm olarak logaritması
(b) 1 bar = 10^5 Pa.
(c) Kum içindeki su içeriğinin yaklaşık olarak %10' u, verimli toprak su içeriğinin %35' i ve kil içindeki suyun %45'i ile ilgilidir.
(d) Alan kapasitesi sabit değildir fakat toprak türüne göre pF 1,5 ve 2,5 arasında değişir.

Su gerilimi su kolonundaki cm olarak veya bar olarak ölçülür. Emme geriliminin geniş aralığından dolayı basitçe cm su kolonunun logaritmasına eşdeğer olan pF değeri olarak ifade edilir.

Alan kapasitesi doğal toprak tarafından uzun süreli yağmurlardan veya yeterli sulama sonrasında 2 günde yerçekimine karşı depolanan su miktarıdır. Karıştırılmamış toprağın doğal bölgesinde tayin edilir. Karışmış veya bir şekilde sarsıntıya maruz kalmış laboratuar toprak örneklerinde ölçüm söz konusu olamaz. Karıştırılmış toprakta belirlenen FC değerlerinde sistematik farklılıklar gözlenmiştir.

Su tutma kapasitesi (Water Holding Capacity, WHC) kapiler taşıma ile taşınan su ile doyurarak, laboratuarda hem karışmış hemde karışmamış toprak ile belirlenebilir. Özellikle karışmış topraklar için daha kullanışlıdır ve alan kapasitesinin %30' undan fazla olabilir (1). Aynı zamanda deneysel olarak tayini güvenilir FC-değerlerinden daha kolaydır.

(1) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

Ek-II

Çeşitli ülkelerden çeşitli toprak tiplerinin nem içerikleri (100 g kuru toprak başına g su)

Toprak türü	Ülke	Toprak nem içeriği		
		WHC[1]	pF = 1,8	pF = 2,5
Kum	Almanya	28,7	8,8	3,9
Verimli toprak kumu	Almanya	50,4	17,9	12,1
Verimli toprak kumu	İsviçre	44,0	35,3	9,2
Alüvyon verimli toprağı	İsviçre	72,8	56,6	28,4
Killi verimli toprak	Birezilya	69,7	38,4	27,3
Killi verimli toprak	Japonya	74,4	57,8	31,4
Kumsu verimli toprak	Japonya	82,4	59,2	36,0
Alüvyon verimli toprak	A.B.D	47,2	33,2	18,8
Kumsu verimli toprak	A.B.D	40,4	25,2	13,3

[1]Su tutma kapasitesi

Ek-III

Şekil 1

Toprak içerisindeki kimyasalların dönüşümlerini çalışmak için akış yollu aygıt örneği (1)(2)

1: iğneli subap vanası

2: su içeren gaz yıkama şişesi

3: ultra-membran (sadece steril şartlarda) gözenek büyüklüğü 0,2 µm

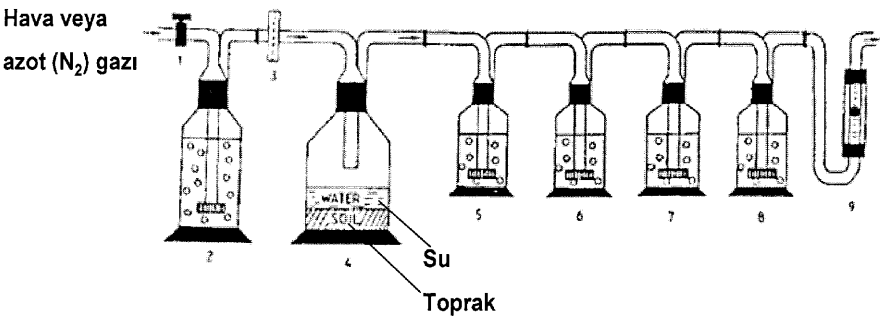
4: toprak metabolizması kabı (aerobik olmayan ve çeltik tarlası koşullarında sadece su ile doyurulmuş olarak)

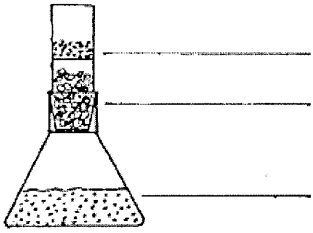
5: organik uçucu bileşikler için etilen glikol tuzak

6: bazik uçucu bileşikler için sülfürik asit tuzağı

7, 8: CO_2 ve diğer asidik uçucular için sodyum hidroksit tuzağı

9: akış ölçer





Şekil 2

Toprak içinde kimyasalların dönüşümlerini çalışmak için biyometre tip kap örneği(3)

(1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

C.24. SULU TORTU SİSTEMLERİNDE AEROBİK VE ANAEROBİK DÖNÜŞÜM

1. YÖNTEM

Bu yöntem OECD TG 308 (2002) yönteminin bir benzeridir.

1.1. Giriş

Kimyasallar sığ ve derin yüzey sularına, doğrudan uygulama, püskürtme ile sürüklenme, kaçak, direnaj, atık boşaltımı, endüstriyel, evsel ve tarımsal atıklar, atmosferik birikme gibi yollarla girebilir. Bu test yöntemi, sulu tortu sistemlerinde organik kimyasalların aerobik ve aerobik olmayan dönüşümlerinin belirlenmesi için bir laboratuvar metodu tanımlar. Varolan yönergelere (1)(2)(3)(4)(5)(6) dayandırılır. 1995 yılında İtalyanın Belgirate şehrinde yapılan Toprak/Tortu seçimi ile ilgili bir OECD uygulamalı seminerinde, bu testte kullanılan tortuların bilhassa tipi ve sayısı üzerinde mutabakata varılmıştır. Bu uygulamalı seminerde, aynı zamanda ISO yönergesi (8) temel alınarak, tortu örneklerinin toplanması, ele alınması ve depolanması ile ilgili gereklilikler belirlenmiştir. Suya doğrudan uygulanarak veya yukarıda açıklanan yollarla, sulu ortamlara ulaşma eğiliminde olan kimyasallar için bu gibi çalışmalara ihtiyaç vardır.

Doğal sulu tortu sistemlerinde, üst su fazında şartlar, çoğu kez aerobiktir. Derin tortu çoğunlukla aerobik değilken, tortunun yüzey tabakası ya aerobik (oksijenlendirilmiş) yada aerobik olmayabilir (oksijensiz). Bu olasılıkların tümü, hem aerobik hem de aerobik olmayan testle bu belgede açıklanmıştır. (Aerobik test, aerobik olmayan değişken kısmın altında yatan aerobik tortunun üzerindeki bir su kolonunu taklit eder.) Aerobik olmayan test, tamamen aerobik olmayan su-tortu sistemlerini taklit eder. Eğer koşullar bu gerekliliklerden belirgin bir şekilde sapmayı gerekli kılıyorsa, örneğin test maddesine maruz kalmış tortu özü ve tortuyu kullanırken, bu amaçla diğer metotlar kullanılabilir.

1.2. Tanımlar ve birimler

Her durumda Uluslararası Standart Birimler (SI) kullanılmalıdır.

Test maddesi: Ana veya dönüşüm ürünleri ile ilgili, herhangi bir madde.

Dönüşüm ürünleri: CO_2 ve bağlı kalıntıları da içeren test maddesinin biyotik (canlılara ait) ve abiyotik (canlı olmayanlara ait) dönüşüm reaksiyonlarından elde edilen tüm maddeler.

Bağlı kalıntılar: "Bağlı kalıntılar" ekstraksiyon sonrası toprak, bitki veya hayvanda, ana madde ve metabolit şeklinde matriks içinde kalmakta ısrar eden maddeleri simgeler. Ekstraksiyon metodu bileşikleri ve matriksin yapısını büyük ölçüde değiştirmemelidir. Bağın doğası matriks-değişim ekstraksiyonu ve gelişmiş analitik metotlar ile aydınlatılabilir. Bugüne kadar, örneğin, kovalent, iyonik ve tutucu bağlar gibi bağlanma şekilleri bu yolla tanımlanmıştır. Genel olarak, bağlı artıkların oluşumu biyolojik erişilirliği ve kullanılabilirliği belirgin bir biçimde azaltır (10) [IUPAC 1984 (11) 'den değiştirilerek] .

Aerobik dönüşüm: (yükseltgen): Moleküler oksijen varlığında gerçekleşen reaksiyonlar (12).

Aerobik olmayan dönüşüm: (indirgen): Moleküler oksijen olmadan gerçekleşen reaksiyonlar (12).

Doğal sular: göletlerden, nehirlerden, akıntılardan vs. elde edilen yüzey suları.

Tortu: Mineral ve organik kimyasal bileşenlerin bir karışımı, ve son olarak yüksek karbon ve azot içerikli ve yüksek molekül kütlesine sahip bileşikler içeren bir karışımıdır. Doğal sularla biriktirilir ve suyla bir ara yüz oluşturur.

Mineralleşme: Aerobik koşullarda bir organik bileşiğin tamamen CO_2 ve H_2O' ya ve aerobik olmayan koşullarda tamamen CH_4, CO_2 ve H_2O' ya bozunmasıdır. Bu test yönteminun içeriğinde, radyoaktif olarak işaretlenmiş bileşik kullanıldığında, mineralleşme, sırasıyla uygun miktarda $^{14}CO_2$ veya $^{14}CH_4$ salınımı ile işaretlenmiş bileşik nicel olarak yükseltgenirken veya indirgenirken, molekülün büyük oranda bozunması anlamına gelir.

Yarı Ömür: $t_{0,5}$, dönüşüm birinci dereceden kinetik ile tanımlandığında, test maddesinin %50 dönüşümü için geçen zamandır; yarı ömür başlangıç konsantrasyonundan bağımsızdır.

DT_{50} (Kaybolma zamanı 50): Test maddesinin ilk derişiminin %50 oranında azaltılması içinde geçen zamandır.

DT_{75} (Kaybolma zamanı 75): Test maddesinin ilk derişiminin %75 oranında azaltılması içinde geçen zamandır.

DT_{90} (Kaybolma zamanı 90): Test maddesinin ilk derişiminin %90 oranında azaltılması içinde geçen zamandır.

1.3. Referans maddeler

Referans maddeleri dönüşüm ürünlerinin spektroskopik ve kromatografik olarak tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılmalıdır.

1.4. Test maddesi hakkında bilgi

İşaretlenmemiş veya izotop ile işaretlenmiş test maddesi, işaretlenmiş madde tercih edilmesine rağmen dönüşüm hızını ölçmek için kullanılabilir. Dönüşümün seyir şekli ile ilgili çalışmalarda işaretlenmiş maddenin kullanılması kütle dengesini belirlemek için gereklidir. ^{14}C ile işaretleme gereklidir, fakat ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P gibi diğer izotopların kullanımı da faydalı olabilir. İşaretleme, mümkün oldukça molekülün en kararlı kısmına veya kısımlarına yerleştirilmelidir[1]. Test maddesinin kimyasal ve radyokimyasal saflığı en az %95 olmalıdır.

Testi gerçekleştirmeden önce, Test maddesi ile ilgili aşağıdaki bilgiler mevcut olmalıdır.

sudaki çözünürlük (Metod A.6);
Organik çözücülerdeki çözünürlük;
Buhar basıncı (Metod A.4) ve Henry yasası sabiti;
n-oktanol/su dağılma katsayısı (Metod A.8);

[1]Örneğin, madde bir halka içeriyorsa, bu halka üzerinde işaretleme gereklidir; eğer test maddesi iki veya daha fazla halka içeriyorsa, her işaretlenmiş halkanın akibetini belirlemek ve dönüşüm ürünlerinin oluşumu ile ilgili uygun bilgiler elde etmek için ayrı çalışmalar gerekebilir.

Adsorpsiyon katsayısı (K_d, K_f veya K_{oc}, uygun olduğunda) (Metod C.18);
Hidrolizi (Metod C.7);
Ayrışma sabiti (pK_a) [OECD yönergesi 112] (13);
test maddesinin kimyasal yapısı ve izotop işaretlemelerin yeri ve yerleri, eğer uygunsa.

Not: Bu ölçümlerin yapıldığı sıcaklık rapor edilmelidir.

ve test maddesinin mikro organizmalar üzerindeki toksisitesini, kolay ve/veya doğal biyolojik bozunabilirliği, toprak içindeki aerobik ve aerobik olmayan dönüşüm, verilerini içeren diğer gerekli bilgiler.

Test maddesinin ve sudaki ve tortudaki dönüşüm ürünlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için analitik metotlar (ekstraksiyon ve temizleme metotlarını içeren) mevcuttur (Bakınız bölüm 1.7.2).

1.5. Test yönteminin ilkesi

Aerobik ve aerobik olmayan sulu tortu (bakınız Ek-I) sistemlerini kullanan, bu testte tanımlanan yöntem aşağıdakilere imkan verir:
Su-tortu sisteminde, test maddesinin dönüşüm oranının ölçümüne,
Tortuda, test maddesinin dönüşüm oranının ölçümüne,
Test maddesinin ve/veya dönüşüm ürünlerinin mineralleşme oranının ölçümüne (^{14}C ile işaretlenmiş test maddesi kullanıldığında)
su ve tortu fazı içinde, dönüşüm ürünlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi, kütle denkliğini de içerecek şekilde (işaretlenmiş test maddesi kullanıldığında),
sabit sıcaklıkta ve karanlıkta (örneğin, deniz yosunu gelişiminden kaçınmak için) inkübasyon periyodunda, iki faz arasındaki test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin dağılımının ölçülmesine imkan verir. Yarı ömürler, DT_{50},DT_{75} ve DT_{90} değerleri veri teminatı gerektiğinde belirlenebilir, fakat deneysel periyodun uzak geçmişine uyarlanmamalıdır (Bakınız bölüm 1.2).

Sırasıyla hem aerobik hem de aerobik olmayan çalışmalar için en az iki tortu ve onunla birlikte bulunan su gereklidir (7). Ancak, ikiden fazla sulu tortu kullanımını gerektiren durumlarda olabilir, örneğin, tatlı suda ve/veya deniz ortamında bulunabilecek kimyasallar için.

1.6. Testin uygulanabilirliği

Metot genelde yeterli doğruluk ve hassasiyete sahip analitik metotların varlığında kimyasal maddelere (işaretlenmiş veya işaretlenmemiş) uygulanabilir. Az miktarda uçucu, uçucu olmayan, suda çözünebilir veya suda çözünürlüğü zayıf olan bileşikler içinde uygulanabilir. Test şartlarında su içinde ve/veya tortuda tutulamayan sudan çok daha uçucu kimyasallar (örneğin dezenfektan, organik çözücüler) için bu test uygulanmamalıdır.
Bu metod, tatlı su içindeki ve tortudaki kimyasalların dönüşümünü çalışmak için belirli bir yere kadar uygulanır, fakat prensipte nehir ağzı/denizle ilgili sistemlere de uygulanabilir. Akarsulardaki (örneğin, nehirler) ve açık denizlerdeki şartları sağlamak (taklit etmek) için uygun değildir.

1.7. Kalite kriterleri

1.7.1. Geri kazanım

En az bir çift su ve tortu örneğine test maddesinin hemen katılmasından sonra yapılan ekstraksiyon ve analiz, analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin ilk belirtisini ve test maddesi için uygulama işleminin kararlılığını gösterir. Deneyin daha sonraki bölümleri için geri kazanım ilgili kütle denkliği ile verilir (işaretlenmiş madde kullanıldığı zaman). Geri kazanımlar, işaretlenmiş kimyasallar için %90 ile %110 aralığında (6), işaretlenmemiş kimyasallar için %70 ile %110 arasında olmalıdır.

1.7.2. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve duyarlılığı

Test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin miktarını belirlemek için kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği (ilk ekstraksiyon verimliliğini hariç tutarak) dönüşüm ürünlerinin oluşumu için yeterince uzun inkübasyon yapılmış aynı su ve tortu örneğinin çoklu analizi ile kontrol edilebilir.

Test maddesi ve dönüşüm ürünleri için analitik yöntemin tayin sınırı (Limit of Detection, LOD) su veya tortu içinde en az 0,01 $mg.kg^{-1}$ (test maddesi gibi) veya test sistemine daha düşük miktarda uygulanan ilk miktarın en az % 1' i kadar olmalıdır. Ek olarak, miktar belirleme (tayin) sınırı (Limit of Quantification, LOQ)' de belirtilmelidir.

1.7.3. Dönüşüm verilerinin doğruluğu

Test maddesi derişimine, zamanın bir fonksiyonu olarak uygulanan regresyon analizi, dönüşüm eğrisinin doğruluğu üzerinde uygun bilgiler verir ve yarı ömürler (eğer yalancı birinci-dereceden kinetik uygulanırsa) veya DT_{50} değerleri ve eğer uygunsa, DT_{75} ve DT_{90} değerleri için güven aralığı hesaplamasına imkan verir.

1.8. Test yönteminin tanımlanması

1.8.1. Test sistemi ve düzenek

Ön bilgilerde (n-oktanol-su dağılım katsayısı, sorpsiyon (tutunma) verileri gibi) test maddesinin cam yüzeyine tutunabileceğini dair bir belirti olmadıkça, çalışma cam kaplar içinde gerçekleştirilmelidir (örneğin, şişeler, santrifüj tüpleri), böyle bir belirti varsa alternatif maddeler (teflon gibi) dikkate alınmalıdır. Test maddesinin cama tutunduğu biliniyorsa, aşağıdaki metotlardan bir veya birkaçını kullanarak bu problemi hafifletmek mümkün olabilir.
Cama tutunan test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin kütlesini belirleyin;
Test sonunda tüm cam kapların çözücüyle yıkandığından emin olun;
Formülasyon ürünleri kullanın (Ayrıca bakınız 1.9.2);
test maddesinin sisteme eklenmesi için, yardımcı çözücünün miktarını artırarak kullanın; eğer yardımcı çözücü kullanılıyorsa, test maddesinin çözünerek başka bir maddeye dönüşmesine imkan vermeyecek bir yardımcı çözücü olmalıdır.

Tipik test düzeneği örnek olarak, gaz akış yollu, biyometre-tip sistemler EK-II' de ve III' de sırasıyla gösterilmiştir (14). Diğer kullanışlı inkübasyon sistemleri referans 15' te açıklanmıştır. Deneysel düzeneklerin tasarımı, hava veya azotun giriş çıkışına izin verecek ve uçucu ürünlerin tutulmasını sağlayacak şekilde yapılmalıdır. Teçhizatın boyutları test

gereksinimleri kısmında belirtilenlere uygun olmalıdır (Bakınız bölüm 1.9.1). Hafifçe baloncuk yaparak veya su yüzeyi boyunca hava veya azot geçirerek havalandırma sağlanabilir. Daha sonraki durumlarda oksijenin ve azotun suda daha iyi dağılması için yüzeyden suyun yavaşça karıştırılması tavsiye edilebilir. Suyun pH' sının yükselmesiyle sonuçlanabileceği için CO_2 içermeyen hava kullanılmamalıdır. Her durumda, tortunun bozulması ve dağılması arzu edilmez, bu durumdan mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. Az uçucu kimyasallar biyometre-tip sistemle yüzey hafifçe karıştırılarak test edilebilir. Uçucu ürünleri tutmak için kafa boşluğunda atmosferik hava yada azot olan kapalı kaplar ve küçük dahili şişeler de kullanılabilir (16). Biyolojik kütle tarafından tüketilen oksijeni telafi etmek için, aerobik testte kafa boşluğundaki gazın düzenli olarak değiş tokuş yapılması gereklidir.

Uçucu dönüşüm ürünlerinin toplanması için uygun tutucular, karbon dioksit[1] ve etilen glikol için, 1 $mol.dm^{-3}$ potasyum hidroksit veya sodyum hidroksit çözeltisi ve organik bileşikler için etanolamin veya ksilen içinde %2 parafin içerirler, fakat bu tutucularla sınırlandırılamazlar. Metan gibi aerobik olmayan koşullar altında oluşmuş uçucular, örnek olarak moleküler elekler vasıtasıyla toplanabilir. Bu gibi uçucular, gaz halinde 900 °C' de bulunan, CuO ile doldurulmuş, quartz tüpten geçerek CO_2 oluşturacak şekilde yakılabilir ve oluşan CO_2 alkali ile soğurucu içinde tuzaklanır (17).

Test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin kimyasal analizi için, yerine göre, radyoaktif olarak işaretlenmiş veya işaretlenmemiş kimyasallar için algılama sistemi içeren laboratuvar cihazına ihtiyaç vardır (örneğin, gaz sıvı kromatografisi (GLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatograifisi (TLC), kütle spektrometresi (MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS), nükleer manyetik rezonans (NMR), vs.). Radyoaktif olarak işaretlenmiş madde kullanıldığında sıvı sintilasyon sayıcısı ve yanma oksitleyicisi de (radyoaktivite analizinden önce tortu örneklerinin yanması için) gerekebilir.
Fizikokimyasal ve biyolojik belirlemeler (bakınız Tablo 1, bölüm 1.8.2.2) için diğer satandart laboratuvar donanımı olarak, cam malzemeler, kimyasallar ve reaktifler yerine göre gerekebilir.

1.8.2. Sulu tortuların seçimi ve sayısı

Örnekleme bölgeleri, belirtilen herhangi bir durum için testin amacına göre seçilmelidir. Örnekleme bölgelerinin seçiminde, bölgenin tarımsal tarihi, havzanın endüstriyel ve evsel girişleri ve suyun kaynağa yakın oluşu göz önünde bulundurulmalıdır. Tortular, önceki 4 yıl içinde eğer test maddesiyle veya yapısal benzerleriyle kirletilmişse kullanılmamalıdır.

1.8.2.1. Tortu örneklerinin seçimi

Aerobik çalışmalarda normal olarak iki tortu örneği kullanılır (7). Seçilen tortu örnekleri organik karbon içeriği ve doku olarak farklı olmalıdır. Tortu örneklerinden biri yüksek organik karbon içeriğine (%2,5-7,5) ve iyi, ince dokuya, diğer tortu örneği ise düşük organik karbon içeriğine (%0,5-2,5) ve kalitesiz, kaba dokuya sahip olmalıdır. Organik karbon içerikleri arasındaki fark normal olarak en az %2 olmalıdır. "İnce doku" içerik olarak >%50 [kil+alüvyon][2] ve "kaba doku" içerik olarak <%50 [kil+alüvyon] olarak tanımlanır. İki tortu

[1] soğurucu olarak kullanılan bu alkalin çözeltiler havalandırmada kullanılan hava içinde bulunan ve aerobik deneylerdeki solunumdan oluşan karbon dioksiti de soğurur, doygunluğa ulaşarak, soğurma kapasitelerini kaybetmelerinden kaçınmak için düzenli aralıklarla değiştirilmeleri gerekir.
[2] [kil+alüvyon] tortunun, partikül büyüklüğü <50 μm olan mineral kısmıdır.

örneği için [kil+alüvyon] içeriğindeki fark normal olarak en az %20 olmalıdır. Bir kimyasalın deniz sularına ulaşabilme durumlarında da, en az bir su-tortu sistemi örneği deniz suyu kökenli olmalıdır.
Aerobik olmayan tam bir çalışma için, yüzey suları kısımlarının aerobik olmayan bölgelerinden iki tortu örneği alınmalıdır (7). Hem tortu fazı hem de su fazı dikkatle ele alınmalı ve oksijenin bulunmadığı bir ortamda dikkatlice taşınmalıdır.

Tortu örneklerinin seçiminde önemli olabilecek diğer parametreler içinde bulunulan duruma göre göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, dönüşüm ve/veya tutunma-salınma pH' ya bağlı olduğunda, tortuların pH aralığı kimyasal testi için önemli olabilir. Tutunma-salınma olayının pH' ya bağlılığı belki test maddesinin pK_a değerinden anlaşılabilir.

1.8.2.2. Su-tortu örneklerinin belirlenmesi

Hem su hem de tortu örneği için ölçülmesi ve rapor edilmesi (kullanılan test metodunun referansı ile) gereken anahtar parametreler ve bu parametrelerin elde edildiği test bölümleri daha sonra tabloda özetlenmiştir. Bu parametrelerin belirlenme metotları hakkında bilgi referans (18)(19)(20)(21)' de verilmiştir.

Ek olarak, duruma göre ölçülmesi ve rapor edilmesi gereken başka parametreler olabilir (örneğin tatlı su için: partiküller, baziklik, sertlik, iletkenlik NO_3/PO_4 (oranı ve ait veriler); tortu örneği için: katyon değiştirme kapasitesi, su tutma kapasitesi, karbonat, toplam azot ve fosfor; deniz ile ilgili sistemlerde; tuzluluk). Özellikle aerobik olmayan dönüşüme bağlı olarak, redoks şartlarını belirlerken, tortu ve su örnekleri için, nitrat, sülfat, biyolojik olarak uygun demir ve diğer potansiyel elektron alıcılarının analizi de faydalı olabilir.

Parametre	Test prosedürü aşamaları					
	Alan örneklemesi	**Sonraki işlem**	**Ortama alıştırmaya başlama**	**Test başlama**	**Test esnasında**	**Testin sonu**
Su						
Köken/kaynak	x					
Sıcaklık	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
O_2 derişimi	x		x	x	x	x
Redoks potansiyeli*			x	x	x	x
Tortu						
Köken/kaynak	x					
Tabaka derinliği	x					
pH		x	x	x	x	x
Partikül büyüklük dağılımı		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobiyal biyokütle**		x		x		x
Redoks potansiyeli *	Gözlem (renk/koku)		x	x	x	x

Su-tortu örneklerinin belirlenmesi için parametrelerin ölçümü (7)(22)(23)

*En son araştırma sonuçları, yüzey suyu içindeki mikrobiyal popülasyonların büyümesi ve gelişimi ile ilişkilendirildiği kadarıyla, su oksijen derişimi ölçümünü ve redoks potansiyelini ne bir mekanistik nede bir tahmin edilen değer olarak göstermiştir (24)(25). Biyolojik oksijen ihtiyacının (BOD, alan örneklemesinde, testin başında ve sonunda) ve su içindeki mikro/makro Ca, Mg ve Mn (testin başında ve sonunda) yapı maddelerinin belirlenmesi ve tortulardaki toplam N ve toplam P' nin ölçümü (alan örneklemesinde ve testin sonunda) aerobik biyolojik dönüşüm hızlarının ve yollarının belirlenmesinde ve yorumlanmasında daha iyi araçlar olabilir.

** Aerobik çalışmalar için mikrobiyal respirasyon hızı metodu (26), tütsüleme metodu (27) veya plaka sayma metodu (örneğin, bakteriler, actinomycetes (aktinomisetler), fungi ve toplam koloniler; aerobik olmayan çalışmalar için metan üretim hızı.

1.8.3. Toplama, elleçleme ve depolama

1.8.3.1. Toplama

Tortuların örneklemesi için, alt tortu örneklemesi ile ilgili taslak ISO yönergesi (8) kullanılmalıdır. Tortu örnekleri, tortu tabakasının 5 ile 10 cm arasındaki üst kısımlarından alınmalıdır. Beraberinde bulunan su aynı bölge veya yerden tortu ile aynı zamanda toplanmalıdır. Aerobik olmayan çalışma için, tortu ve beraberinde bulunan su, oksijen bulunmayan şartlarda toplanmalı ve taşınmalıdır (28)(Bakınız 1.8.2.1). Bası örnekleme cihazları literatürde açıklanmıştır (8)(23).

1.8.3.2. Elleçleme

Filtreleme ile tortu sudan ayrılır ve tortu 2 mm' lik elekten fazladan bölge suyu kullanılarak ıslak olarak geçirilir daha sonra bu su atılır. Bilinen miktardaki tortu ve su arzu edilen oranda (bakınız 1.9.4) inkübasyon kaplarında karıştırılır ve alıştırma periyodu için hazırlanır (bakınız bölüm 1.8.4). Aerobik olmayan çalışma için, bütün elleçleme basamakları oksijen bulunmayan ortamda gerçekleştirilir (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3. Depolama

Taze alınmış tortu ve su örneğinin kullanımı zorunludur, fakat depolama gerekiyorsa, tortu ve su örneği yukarıda belirtildiği şekilde süzülmelidir ve beraber su ile doyurulmuş şekilde (tortu üzerinde 6-10 cm su tabakası olacak şekilde), karanlıkta ve $4\pm2°C^{4)}$ de maksimum 4 hafta olacak şekilde depolanmalıdır (7)(8)(23). Aerobik olmayan çalışmalar için olanlar oksijen olmayan ortamda depolanırken, aerobik çalışmalarda kullanılacak örnekler, serbest hava erişimine izin verecek şekilde depolanmalıdır (örneğin açık kapların içerisinde). Depolama ve taşıma esnasında su ve tortu örneklerinin donması ve tortunun kuruması meydana gelmemelidir.

1.8.4. Test için tortu/su örneklerinin hazırlanması

Alıştırma periyodu, ana testte kullanılacak her tortu/su örneği inkübasyon kabına koyularak, test maddesi eklenmeden önce yapılmalı ve alıştırma test inkübasyonu ile aynı şartlar altında gerçekleştirilmelidir (Bakınız bölüm 1.9.1). Alıştırma periyodu sistemin makul bir kararlılığa ulaşması için gereken zamandır, pH, su içindeki oksijen derişimi, tortu ve suyun redoks potansiyeli ve fazların makroskopik olarak ayrılmasından anlaşılabilir. Alıştırma periyodu

normalde bir hafta ile iki hafta arasında sonlanmalıdır ve dört haftayı geçmemelidir. Bu periyot esnasındaki tespitlerden elde edilen sonuçlar rapor edilmelidir.

1.9. Testin performansı

1.9.1. Test şartları

Test, su tortu hacim oranı 3:1 ve 4:1 arasında olacak şekilde ve tortu tabakası 2,5 cm (±0,5 cm)[1] olacak şekilde inkübasyon teçhizatı içinde gerçekleştirilmelidir (Bakınız 1.8.1). İnkübasyon kabı başına en az 50 g tortu (kuru ağırlık esas alınarak) miktarı gereklidir.

Test karanlıkta, 10 ile 30 °C aralığındaki bir sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmelidir. (20 ±2) °C bir sıcaklık uygundur. Uygun olduğunda, durumdan duruma farklılık esasına göre daha düşük sıcaklıklar (örneğin, 10 °C) testten elde edilmesi gereken bilgiye bağlı olarak, dikkate alınabilir. İnkübasyon sıcaklığı izlenmeli ve rapor edilmelidir.

1.9.2. Test maddesinin muamelesi ve uygulaması

kimyasalın bir test derişimi kullanılır2 nci suya doğrudan uygulanan mahsul (ürün) koruma kimyasalları için, etiket üzerindeki maksimum doz, test kabındaki suyun yüzey alanı esas alınarak hesaplanmış maksimum uygulama hızı olarak alınmalıdır. Diğer tüm durumlarda, kullanılacak derişimler, çevresel emisyonlardan tahmin esasına göre olmalıdır. Dönüşüm yolunu, dönüşüm ürünlerinin oluşumunu ve dönüşüm ürünlerindeki azalmayı karakterize etmek için, yeterli miktarda test maddesinin uygulandığından emin olmak için dikkat gösterilmelidir. Test maddesi derişiminin, testin başında, algılama limitine yakın olduğu yerlerde ve/veya test maddesinin uygulama hızı %10' daykenbaşlıca dönüşüm ürünleri kolayca algılanamadığı durumlarda, daha yüksek dozların (örneğin 10 kat daha fazla) uygulanması gerekebilir. Ancak, daha yüksek test derişimleri kullanılıyorsa, bunların su-tortu sistemi üzerinde belirgin bir yan etkisinin olmaması gerekir. Farklı boyutlardaki kaplar içinde, test maddesinin sabit derişimlerini elde etmek için uygulanan madde miktarındaki bir ayarlamanın uygun olduğu düşünülür, bu işlem kaptaki su derinliğinin alandaki su derinliğine göre ayarlanması esasına göre yapılır (100 cm olduğu varsayılır, fakat diğer derinlikler kullanılabilir). Örnek hesaplama için EK-IV' de bakınız.

Test maddesi ideal olarak, test sisteminin su fazına sulu çözelti olarak uygulanmalıdır. Eğer kaçınılmazsa, test maddesinin uygulanması ve dağılımı için düşük miktarda su ile karışabilen çözücülerin kullanımına izin verilir, fakat bu %1 v/v değerini geçmemeli ve test sisteminin mikrobiyal aktivitesi üzerinde ters bir etkisi olmamalıdır.

Test maddesinin sulu çözeltisini üretirken dikkat göstermek gerekir, tam homojenlikten emin olmak için jeneratör kolonların ve ön-karıştırma uygundur. Test sistemine sulu çözeltinin eklenmesini takiben, su fazının yavaşça karıştırılması ve tortunun mümkün olduğunca az karıştırılması tavsiye edilir.
Her ne kadar, suda az çözünen test maddeleri için, formüle edilmiş maddelerin kullanımı uygun bir alternatifse de, formülünde bulunan maddeler, test maddesinin ve/veya su ve tortu

[1] Yakın zamanda yapılan çalışmalar, 4 °C' depolamanın, mikrobiyal aktivitede düşmeyle sonuçlanabilecek şekilde, tortunun organik karbon içeriğinin azalmasına sebep olacağını göstermiştir (34).
[2] Belirgin olarak farklı derişimlerle sonuçlanacak, farklı giriş yollarıyla yüzey sularına ulaşan kimyasallar için, düşük derişimlerin yeterli doğrulukta analiz edilebilmesi koşuluyla, ikinci bir derişim ile test yapmak kullanışlı olabilir.

fazı arasındaki dönüşüm ürünlerinin, dağılımını etkileyebileceği durumlarda rutin olarak formüle edilmiş ürünlerin kullanımı tavsiye edilmez.

İnkübasyon kaplarının sayısı örnekleme sayısına bağlıdır (Bakınız bölüm 1.9.3). Her örnekleme zamanında iki sistem feda edilebileceğinden, yeterli sayıda test sistemi dahil edilmelidir. Her sulu tortu sisteminin kontrol birimleri kullanıldığında, bunlar test maddesi ile muamele edilmemelidir. Bu kontrol birimleri, testin bitiminde, tortunun mikrobiyal biyolojik kütlesini (biyokütle), ayrıca suyun ve tortunun toplam organik karbon miktarını belirlemek için kullanılabilir. Bu kontrol birimlerinden iki tanesi, (örneğin, bir sulu tortunun bir kontrol birimi) alıştırma periyodu esnasında, su ve tortu içindeki ihtiyaç duyulan parametrelerin izlenmesi için kullanılabilir (Bakınız bölüm 1.8.2.2' deki Tablo). Test sisteminin mikrobiyal aktivitesi üzerindeki olumsuz etkilerini ölçmek için çözücü aracılığıyla test maddesi uygulandığında, ek olarak iki kontrol birimi de dahil edilmelidir.

1.9.3. Test süresi ve örnekleme

Deney süresi normal olarak 100 günü geçmemelidir (6), ve bozunma süreci başlayana ve su/tortu dağılım modeli kurulana kadar veya test maddesinin %90' ı dönüşüm ve/veya buharlaşmayla harcanana kadar devam ettirilmelidir. Örnekleme zamanı sayısı en az altı olmalı (sıfırıncı zaman dahil), test maddesi ile ilgili, önceki çalışmalardan yeterince veri bulunmadığı durumlarda, uygun örnekleme yönetimini ve test süresini elde etmek için bir isteğe bağlı öncü çalışma gerçekleştirilebilir. Hidrofobik (suyu sevmeyen) test maddeleri için, su ve tortu fazları arasındaki dağılım hızını belirlemek için, testin ilk periyodu içinde ek örnekleme noktaları gerekli olabilir.

Uygun örnekleme zamanlarında, inkübasyon kaplarının (veya bir kopyaları) tümü analiz için ayrılmalıdır. Tortu ve üst tabakada bulunan su ayrı ayrı analiz edilmelidir[1]. Yüzey suyu dikkatlice tortu minimum oranda dağıtılacak şekilde uzaklaştırılmalıdır. Test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin eksatraksiyonun da ve belirlemesinde uygun analitik yöntemler izlenmelidir. İnkübasyon kabına ve uçucuları yakalamak için birleştirilmiş tüplere tutunmuş olan maddeleri ayırmak için dikkat gösterilmelidir.

1.9.4. İsteğe bağlı ön test

Eğer, test maddesi üzerinde süre ve örnekleme rejimi ilgili çalışmalardan hesaplanamazsa, nihai test için önerilmiş şartlarla aynı şartlarda gerçekleştirilebilecek, uygun bir isteğe bağlı ön test göz önünde bulundurulabilir. Eğer böyle bir test gerçekleştirilirse, bu testle ilgili deneysel şartlar ve sonuçlar kısaca rapor edilmelidir.

1.9.5. Ölçüm ve analiz

Test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin her örnekleme zamanındaki su ve tortu içindeki derişimi ölçülmeli ve rapor edilmelidir (uygulanan derişim ve yüzde olarak). Genelde, uygulanan radyoaktivitenin ≥%10' da algılanmış dönüşüm ürünleri, başka türlü bir haklı neden olmadıkça, su-tortu sistemi içinde, herhangi bir örnekleme zamanında tanımlanmalıdır. Çalışma süresince derişimleri sürekli artan dönüşüm ürünleri, derişimleri yukarıda verilen sınırları aşmasa bile devamlılığı gösterebilecek şekilde, tanımlama için dikkate alınmalıdır. Daha sonrakiler, haklı nedenler raporda belirtilecek şekilde duruma göre değerlendirilmelidir.

[1] aerobik olmayan dönüşüm ürünlerinin kolayca yeniden yükseltgenmesinin olabileceği durumlarda, örnekleme ve analiz esnasında aerobik olmayan şartlar korunmalıdır

Gazlar veya uçucuları tutma sistemlerinden elde edilen sonuçlar (CO_2 ve diğerleri, örneğin uçucu organik bileşikler) her örnekleme zamanı için rapor edilmelidir. Mineralleşme oranları rapor edilmelidir. her örnekleme noktası için tortu içindeki ekstrakte edilemeyen (bağlı) kalıntılar, rapor edilmelidir.

2. VERİLER

2.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Eklenen radyoaktivitenin toplam kütle dengesi veya geri kazanımı (Bakınız bölüm 1.7.1) her örnekleme zamanında hesaplanmalıdır. Sonuçlar eklenen radyoaktivitenin yüzdesi olarak ifade edilmelidir. Su ve tortu arasındaki radyoaktivitenin dağılımı, derişimler ve yüzdeler olarak, her örnekleme zamanında rapor edilmelidir.

Test maddesinin, Yarı ömür, DT_{50} ve eğer uygunsa, DT_{75} ve DT_{90} değerleri, güven aralıkları ile birlikte hesaplanmalıdır (Bakınız bölüm 1.7.3). Test maddesinin, su ve tortu içindeki harcanma hızı hakkında bilgi uygun değerlendirme araçlarının kullanımıyla elde edilebilir. Bunlar yalancı-birinci derece kinetik uygulama, grafiksel ve sayısal çözümlere ve daha karmaşık değerlendirmeler kullanarak uygulanan, basit eğri uydurma teknikleri, örneğin, tekli ve çoklu-bölüm modelleri, kullanılarak sıralanabilir. Daha fazla detay yayınlanmış ilgili literatürden elde edilebilir (35)(36)(37).

Bütün yaklaşımların, oldukça değişken karmaşıklıkta, kendi güçlü ve zayıf yanları vardır. Bir birinci dereceden kinetik varsayımı, bozunma ve dağılma işleminin fazla basitleştirilmesi olabilir, fakat mümkün olduğunda, simülasyon modellemede ve tahmin edilen çevresel derişimlerin hesaplanmasında kolayca anlaşılan terimler (hız sabiti yada yarı ömür) ve değerler verir. Basit yaklaşımlar ve doğrusal dönüşümler verilere göre eğrilere daha iyi uyan sonuçlar verebilir ve bu nedenle, her ne kadar sınırlandırılsa da, yarı ömürlerin, DT_{50} ve uygunsa, DT_{75} ve DT_{90} değerlerinin daha iyi hesaplanmasına ve türetilmiş sabitlerin kullanımına izin verir. Ortam modelleri (Compartment models), kimyasalın farklı ortamlardaki bozunma ve dağılma hızını açıklayan risk değerlendirmesi içinde, belli bir sayıda kullanışlı sabitler türetebilir. Bunlar aynı zamanda ana dönüşüm ürünlerinin oluşumu ve bozunması için hız sabitlerinin hesaplanmasında da kullanılabilir. Tüm durumlarda, Seçilen metot doğrulanmalı ve deneyi gerçekleştiren kişi, grafiksel ve/veya istatistiksel olarak iyi uyumu göstermelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test raporu

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test maddesi:

- genel adı, kimyasal adı, CAS numarası, yapısal formülü (radyoaktif olarak işaretlenmiş malzeme kullanıldığında, işaretin veya işaretlerin yerini göstererek) ve ilgili fizikokimyasal özellikler;
- Test maddesinin saflığı (safsızlıklar);
- İşaretlenmiş kimyasalın radyokimyasal saflığı ve molar aktivitesi (uygun olduğunda)

Referans maddeler:
- Dönüşüm ürünlerinin belirlenmesini ve/veya tanımlanması için kullanılan referans maddelerinin kimyasal adı ve yapısı

Test tortuları ve suyu:
sulu tortu örnekleme bölgesi ve bölgelerinin yeri ve açıklaması, mümkün olduğunca, kirlenme geçmişini de içerecek şekilde;
Su-tortu sistemlerinin toplaması, depolaması (eğer varsa) ve alıştırılması ile ilgili tüm bilgiler;
Bölüm 1.8.2.2 deki Tablo' da listelendiği gibi su-tortu örneklerinin özellikleri

Test koşulları:
- Kullanılan test sistemi (örneğin, akış-yollu, biyometre, havalandırma yollu, karıştırma metodu, su hacmi, tortunun kütlesi, hem su hemde tortu tabakasının kalınlığı, test kaplarının boyutları vs.)
- Test maddesinin, test sistemine uygulanması: kullanılan test derişimi, test maddesi uygulamasının, tekrar sayısı ve kontrol modları (örneğin, eğer varsa çözücü kullanımı), vs.
- inkübasyon sıcaklığı;
- örnekleme zamanları:
- ekstraksiyon metotları ve etkinlikleri, analitik yöntemler ve algılama sınırları;
- dönüşüm ürünlerinin belirlenmesinde/tanımlanmasında kullanılan metotlar;
- çalışma esnasında test protokolünden ve koşullarından sapmalar.

Sonuçlar:
- temsili analizlerin ham veri şekilleri (tüm ham veriler GLP arşivinde saklanmalıdır);
- kullanılan analitik metodun tekrarlanabilirliliği ve hassasiyeti;
- Geri kazanım oranları (geçerli bir çalışma için % değerler bölüm 1.7.1' de verilir)
- test maddesi, dönüşüm ürünleri için ve ekstrakte edilemeyen radyoaktivite için uygulanan dozun yüzdesi ve mg.kg-1 suda, tortuda toplam sistemde (sadece %) olarak ifade edilen sonuçlar tablosu;
- çalışma esnasında ve sonundaki kütle dengesi;
- su ve tortu kısımları ve toplam sistem içindeki dönüşümün (mineralizasyonu da içerecek şekilde) grafik olarak gösterimi;
- Mineralleşme oranları;
- Test maddesi ve uygun olduğunda su, tortu ve toplam sistem içindeki güven aralıklarını da içeren ana dönüşüm ürünleri için, yarı ömür, DT50 ve eğer uygunsa, DT75 ve DT90 değerleri;
- Test maddesinin ve uygun olduğunda ana dönüşüm ürünlerinin dönüşüm kinetiği değerlendirmesi;
- uygun olduğunda, önerilen dönüşüm yolu;

Sonuçların tartışması.

4. KAYNAKLAR

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) TS 9547 ISO 5667-12. Su Kalitesi- Numune Alma- Bölüm 12: Dip Sedimentlerinden Numune Alma Kılavuzu

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop "A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.
(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.
(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.
(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.
(27) TS ISO-14240-2 Toprak Kalitesi- Toprak Mikrobiyal Biyokütlesi Tayini- Tütsüleme Özütleme Metodu
(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.
(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.
(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.
(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.
(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.
(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.
(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer, 39, 187 - 203.
(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer, 33, 47 - 60.
(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases, pp 1349-1354.

Ek-I

Aerobik test ve anaerobik test sistemleri hakkında yönerge

Aerobik test sistemi

Bu yöntemde açıklanan aerobik test sistemi, yüzeyde aerobik ve yüzeyin altında aerobik olmayan (tortunun, aerobik olmayan bölgedeki tipik ortalama redoks potansiyeli (E_h) aralığı -80 ile -190 mV arası), bir aerobik su tabakası (tipik oksijen derişim aralığı 7 ile 10 mg/L kadar) ve bir tortu tabakasından oluşur. Kafa boşluğundaki yeterli oksijeni korumak için her inkübasyon birimindeki su yüzeyinden nemlendirilmiş hava geçirilir.

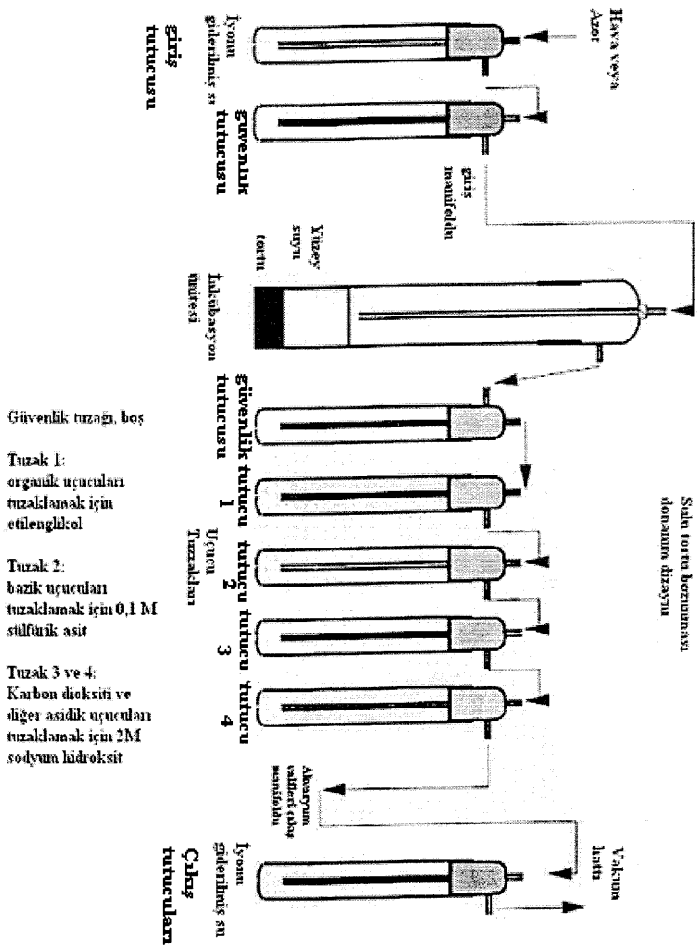
Anaerobik test sistemi

Anaerobik test sistemi için, test işlemi aerobik sistem için bahsedilenle esasen aynıdır, istisnai olarak kafa boşluğundaki azotu korumak için her inkübasyon birimindeki su yüzeyinden nemlendirilmiş azot geçirilir. Redoks potansiyeli (E_h) -100 mV değerinden az olduğunda tortu ve suyun aerobik olmadığı düşünülür.

Anaerobik testte, mineralleşmenin değerlendirilmesi açığa çıkan karbon dioksitin ve metanın da ölçümünü içerir.

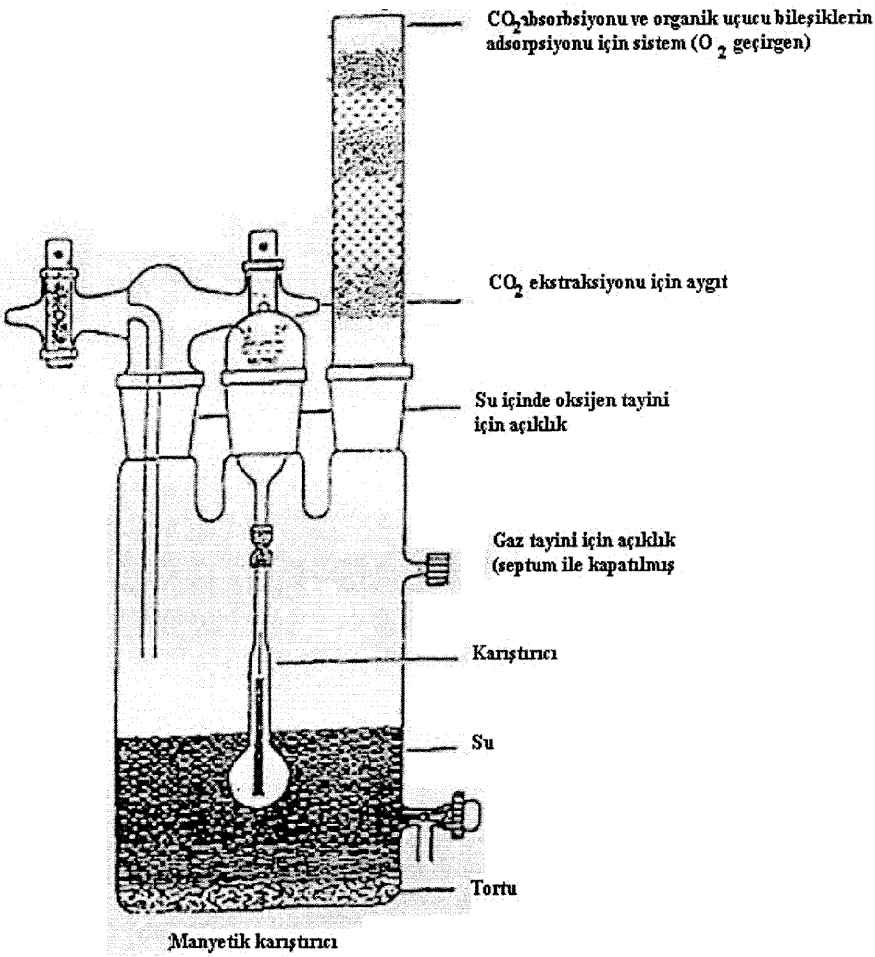
Ek-II

Bir gaz akış yollu düzenek örneği



Ek-III

Biyometre düzeneği örneği



Ek-IV

Test kaplarına uygulanan doz için, örnek hesaplama

Silindir iç çapı: = 8 cm

Tortu içermeyen su kolonunun derinliği = 12 cm

Yüzey alanı: 3,142 x 4^2 = 50,3 cm^2

Uygulama oranı: 500 g test maddesi/ha ifadesinin karşılığı olarak 5 µg/cm^2

Toplam µg: 5 x 50,3 = 251,5 g

100 cm' lik bir derinliğe göre miktarı ayarla:
12 x 251,5 ÷ 100 = 30,18 µg

Su kolonun hacmi : 50,3 x 12 = 603 ml

Sudaki derişim: 30,18 ÷ 603 = 0,050 µg/ml veya 50 µg/l

C.25. YÜZEY SULARINDA AEROBİK MİNERALİZASYON — BİYOBOZUNMA TESTİ SİMÜLASYONU

1. YÖNTEM

Bu yöntem, OECD TG 309 (2004) ile eşdeğerdir (1).

1.1. Giriş

Bu yöntemin amacı, düşük konsantrasyonda oksijenli doğal su içerisindeki test maddesinin biyobozunma sürecini ölçmek ve kinetik hız ifadesi biçimindeki gözlemleri nicel olarak değerlendirmektir. Bu simülasyon testi, doğal yüzey suları (taze, tuzlu ya da deniz) numunelerindeki organik maddelerin oksijenli biyolojik bozunma hızını belirlemek için yapılan laboratuvar çalkalama şişesi kesikli testidir. Bu, ISO/DIS 14592-1 (2)'ye dayanır ve dahası test yöntemleri C.23 ve C.24'de yer alan öğeleri de içerir (3)(4). İsteğe bağlı olarak uzun test süreleri ile yarı-sürekli işlem, test mikrokozmunun bozulmasını engellemek amacıyla kesikli işlemin yerine geçer. Simülasyon testinin temel amacı, yüzey suyu içindeki test maddesinin mineralizasyonu belirlemektir ve mineralizasyon bozunma kinetiğinin temel ifadesidir. Ancak testin tercihe bağlı ikincil amacı; birincil bozunma ve ana dönüşüm ürünlerinin oluşumu hakkında bilgi edinmektir. Dönüşüm ürünlerinin tanımlanması ve eğer mümkün ise bunların derişim miktarının ölçümü, özellikle yavaş bir şekilde mineralize olan maddeler (örneğin toplam artık 14C için 60 günü aşan yarı ömürlere sahip olanlar) için önemlidir. Test maddesinin daha yüksek derişimleri (örn. > 100 µg/l), analitik sınırlamalardan dolayı ana dönüşüm ürünlerinin tanımlanması ve miktarlarının ölçülmesi için kullanılmalıdır.

Bu test içindeki düşük derişim, ortam içinde beklenenleri gösteren test içerisinde elde edilen biyolojik bozunma kinetiklerini sağlamak için yeterli olan derişim (örn. 1 µg/l ila 100 µg/l'den daha az) anlamına gelir. Test için kullanılan doğal suda uygun olan biyolojik olarak parçalanabilir karbon substratların toplam kütlesine göre düşük derişimde bulunan test maddesi, ikincil substrat olarak hizmet edecektir. Bu, öngörülen biyolojik bozunma kinetiklerinin birinci derece ('büyümeyen' kinetikler) olduğunu ve test maddesinin, 'eşmetabolizma' ile bozulabileceğini belirtir. Birinci derece kinetikler, bozunma oranının (mg/L/gün), zamanla azalan substrat derişimi ile orantılı olduğunu gösterir. Doğru birinci derece kinetikler ile özel bozunma hızı sabiti, k, süreden ve derişimden bağımsızdır. Diğer bir deyişle bu hız sabiti deney uygulaması esnasında ve eklenen derişimler ile deneyden deneye değişmez. Tanım gereği özel bozunma hızı sabiti birim zamandaki derişimin bağıl değişimine eşittir: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Birinci derece kinetikler, normalde önceden tanımlanmış koşullar altında beklense de diğer kinetiklerin daha uygun olabileceği durumlar olabilir. Eğer biyolojik tepkime hızı yerine difüzyon hızı gibi kütle transferi olayları biyodönüşüm hızını sınırlandırıyor ise birinci derece kinetiklerden sapmalar gözlemlenebilir. Bununla birlikte veri hemen hemen her zaman, derişime bağlı hız sabitini kabul eden psödo birinci derece kinetiklerle tanımlanabilir.

Deneysel planlamaları yapmak ve sonuçların yorumlanmasına yardımcı olmak için; yüksek derişimlerdeki test maddesinin biyobozunurluğuna ilişkin bilgilerin (örn. Standart izleme testlerinden) yanı sıra abiyotik bozunma, dönüşüm ürünleri ve ilgili fizyokimyasal özelliklere ilişkin bilgiler de testten önce mevcut olmalıdır. 14C olarak işaretlenmiş test maddelerinin kullanımı ve test bitimindeki 14C faz dağıtımının tayini, nihai biyolojik bozunmanın belirlenmesine olanak sağlar. İşaretlenmemiş test maddesi kullanıldığında, nihai biyolojik

bozunma, sadece daha yüksek bir derişim test edildiğinde ve ana dönüşüm ürünleri biliniyor ise tahmin edilebilir.

1.2. Tanımlar

Birincil biyobozunma: Kimyasal kimliğin kaybolması ile sonuçlanan, kimyasal maddenin mikroorganizmalarla yapısal değişimi (dönüşüm).

Fonksiyonel biyobozunma: Özgün özelliğin kaybolması ile sonuçlanan, kimyasal maddenin mikroorganizmalarla yapısal değişimi (dönüşüm).

Nihai oksijenli biyobozunma: Bir kimyasal maddenin oksijen varlığında mikroorganizmalarla karbondioksit, su ve o madde içinde bulunan herhangi bir elementin mineral tuzlarına (mineralizasyon) parçalanması ve yeni biyokütle ve organik mikrobiyal biyosentez ürünlerinin üretilmesidir.

Mineralizasyon: Bir kimyasal maddenin veya organik maddenin oksijen varlığında mikroorganizmalarla karbondioksit, su ve o madde içinde bulunan herhangi bir elementin mineral tuzlarına (mineralizasyon) parçalanmasıdır.

Gecikme fazı: Testin başlangıcından, bozunmaya neden olan mikroorganizmaların adaptasyonu gerçekleşene ve kimyasal madde ya da organik maddenin biyolojik bozunma derecesi tayin edilebilir seviyeye yükselmesine kadar geçen süre (örneğin ölçme tekniğinin doğruluğuna bağlı olarak maksimum kuramsal biyobozunmanın %10'u ya da daha azı).

Maksimum biyobozunma seviyesi: Kimyasal madde ya da organik maddenin, test esnasında yüzde olarak kaydedilmiş ve daha yüksek yüzdelerde bozunmanın olmadığı, biyobozunma derecesi.

Birincil substrat: Mikrobiyal biyokütlenin büyümesini ve korunmasını sağlayan doğal karbon ve enerji kaynakları yığını.

İkincil substrat: Bozunmasıyla, ana substrat bileşenlerinin (birincil substratların) bozunmasıyla ortaya çıkan karbon ve enerjiye kıyasla yetkin organizmaya sadece önemsiz bir miktarda karbon ve enerji sağlayan, düşük derişimli substrat bileşeni.

Bozunma hızı sabiti: Bozunma sürecinin hızını belirleyen, birinci dereceden ya da psödo birinci dereceden kinetik hız sabiti, k (d–1). Kesikli bir deney için, k, gecikme fazının bitiminden sonra bozunma eğrisinin başlangıcından tahmin edilir.

Yarı-ömür, t1/2 (d): Birinci derece tepkimenin hızını ifade etmek için kullanılan terim. Derişimin iki kat azaldığı zaman aralığıdır. Yarı ömür ve bozunma hızı sabiti, $t1/2 = \ln 2/k$ denklemiyle bağlantılıdır.

Bozunma yarı ömrü, DT50 (d): Biyobozunma testlerinin sonuçlarını nicel olarak değerlendirmek için kullanılan terim. Bu terim, gecikme fazında geçen süre dahil %50 biyobozunma değerine ulaşılması için gereken zaman aralığıdır.

Saptama sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ): Saptama sınırı (LOD), insan yapımı analitik aletler ile belirlenemeyen en düşük madde derişimidir. Miktar tayin sınırı (LOQ), kabul edilebilir doğruluk ile belirlenemeyen en düşük madde derişimidir.

Çözünmüş organik karbon (DOC): Bir su numunesinin içindeki, özel faz ayrımıyla uzaklaştırılamayan organik karbon kısmıdır, örneğin 15 dakika 40000 ms–2 de santrifüjle ya da 0,2 µm-0,45 µm gözenek çapına sahip membranlar kullanılan membran filtrasyonuyla.

Toplam organik 14C aktivitesi (TOA): Organik karbon ile ilgili toplam organik 14C aktivitesi.

Çözünmüş organik 14C aktivitesi (DOA): Çözünmüş organik karbon ile ilgili toplam organik 14C aktivitesi.

Parçacık organik 14C aktivitesi (POA): Parçacık organik karbon ile ilgili toplam organik 14C aktivitesi.

1.3. Testin Uygulanabilirliği

Bu simülasyon testi, düşük derişimlerde test edilmiş uçucu olmayan ya da kısmen uçucu organik maddelere uygulanabilir. Atmosfere açık şişeler kullanılan (örneğin hidrofil pamuk tıkaçlanmış), 1 $Pa \cdot m^3/mol$'den (yakl. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) daha az Henry Kanunu sabiti olan maddeler, pratikte uçucu olmayan olarak kabul edilebilir. Feyyür ayarı ile kapalı şişeler kullanarak, test sisteminden hiçbir kayıp olmadan kısmen uçucu maddeleri (Henry Kanunu sabiti, < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ ya da $< 10–3$ $atm \cdot m^3/mol$) test etmek mümkündür. Eğer CO_2 sıyrıldığında doğru önlemler alınmaz ise, 14C olarak işaretlenmiş maddenin kaybı meydana gelebilir. Bu gibi durumlarda, alkali ile dahili bir soğurucu içinde CO_2 tutmak ya da harici bir CO_2 soğurucu sistem (doğrudan $14CO_2$ tayini; bakınız Ek-III) kullanmak gerekebilir. Biyobozunma kinetiklerinin tayini için test maddesinin derişimleri sudaki çözünürlüğünden daha düşük olmalıdır. Bununla birlikte sudaki çözünürlüğün literatür değerinin, doğal sulardaki test maddesi çözünürlüğünden bir hayli büyük olabileceği dikkate alınmalıdır. İsteğe bağlı olarak, özellikle suda az çözünen test maddelerinin çözünürlüğü, test edilmiş doğal suların kullanımıyla saptanabilir.

Yöntem, kaba parçacıklardan kurtulmuş yüzey suyun içinde (pelajik test) ya da çalkantılı yüzey suları içinde simüle edilen biyobozunma için kullanılabilir, örneğin; su/tortu ara yüzeyi yanında oluşabilir (askıda tortu testi).

1.4. Testin İlkesi

Test; askıda katılar veya yeniden askıya alınmış tortular ile su kütlesini simüle etmek için ya sadece yüzey suyu (pelajik test) ya da 0,01 den 1 g/L'ye kuru ağırlığın (askıda tortu testi) askıda katıları/tortuları ile değiştirilmiş su kütlesi ile test maddesini inkübe ederek seri halinde uygulanır. Bu aralığın daha düşük düzeylerinde askıda katı/tortu derişimi, genellikle yüzey suları içindir. Test şişeleri, oksijenli ortam ve uyarma altında çevre sıcaklığında, karanlık içerisinde inkübe edilir. Bozunma kinetiklerinin tayinini gerçekleştirmek amacıyla en az iki farklı derişime sahip test maddesi kullanılmalıdır. Derişimler, birbirinden 5 ila 10 faktör farklı olmalıdır ve çevresel ortamdaki beklenen derişim aralığını temsil etmelidir. Test maddesinin maksimum derişimi 100 µg/L'yi geçmemelidir, 10 µg/L ya da daha altındaki maksimum test derişimleri, birinci derece kinetikleri takip eden biyobozunmayı sağlamak için tercih edilir. En

düşük derişim 10 µg/L'yi geçmemelidir ancak 1-2 µg/L ya da 1 µg/L'den daha az en düşük test derişimleri tercih edilir. Genel olarak bu gibi düşük derişimin uygun bir analizi, ticari olarak erişilebilen 14C işaretlenmiş maddelerin kullanımıyla gerçekleştirilebilir. Eğer test maddesi, bir derişimde ≤ 100 µg/L uygulanır ise analitik sınırlamalardan dolayı gereken doğruluk ile test maddesi derişimini ölçmek imkânsız olabilir (bakınız başlık 1.7.2, ikinci paragraf). Test maddesinin daha yüksek derişimleri (> 100 µg/L ve bazen > 1 mg/L), ana dönüşüm ürünlerinin tanımlanması ve nicel olarak değerlendirilmesi için ya da düşük saptama seviyesi ile özel yöntem analizinin uygun olmadığı durumlar için kullanılabilir. Eğer test maddesinin yüksek derişimleri test edilmiş ise, bozunma muhtemelen birinci dereceden bir kinetiğe sahip olmayacağından, sonuçları kullanmak, birinci derece bozunma sabitini ve yarı ömrü tahmin etmek için mümkün olmayabilir.

Bozunma, özel kimyasal analizi kullanıldığında ya 14C artığını ya da test maddesinin artık derişiminin ölçümüyle uygun zaman aralıklarında takip edilir. Özel analiz kullanımı gibi molekülün en az kararlı kısmının 14C ile işaretlenmesi sadece birincil biyobozunmanın değerlendirmesini sağlarken, molekülün en kararlı kısmının 14C ile işaretlenmesi toplam mineralizasyonun tayinini sağlar. Bununla birlikte en kararlı kısım, zorunlu olarak molekülün ilgili fonksiyonel kısmını içermez (toksisite, biyobirikim vb. özgün özellikler ile ilgili olabilir). Bu durumda özgün özelliğin ayrılması amacıyla fonksiyonel kısımda 14C işaretlenmiş test maddesini kullanmak uygun olabilir.

1.5. Test Maddesi Hakkında Bilgi

Radyoaktif olarak işaretlenmiş veya işaretlenmemiş test maddeleri bu testte kullanılabilir. 14C işaretleme tekniği tavsiye edilir ve işaretleme normal olarak molekülün en kararlı kısımlarında olmalıdır (bakınız bölüm 1.4). Birden daha fazla aromatik halka içeren maddeler için her halka içindeki bir ya da daha fazla karbon tercihen 14C olarak işaretlenmelidir. Ek olarak kolayca bozunabilir bağların her iki tarafındaki bir ya da daha fazla karbon tercihen 14C işaretli olmalıdır. Test maddelerinin kimyasal ve/veya radyokimyasal saflığı > %95 olmalıdır. Düşük başlangıç derişimleri ile yürütülen testlerdeki 14C ölçümlerini kolaylaştırmak amacıyla radyoaktif olarak işaretlenmiş maddeler için yaklaşık 50 µCi/mg (1,85 MBq) ya da daha fazlasının özel aktivitesi tercih edilir. Test maddesine ilişkin aşağıdaki bilgi mevcut olmalıdır:
— sudaki çözünürlük [Yöntem A.6],
— organik çözücüdeki çözünürlük (çözücü ya da sudaki düşük çözünülürlükle uygulanabilen maddeler),
— eğer madde protonlama ya da deprotonlamaya hassas ise ayrışma sabiti (pKa) [OECD TG 112] (5),
— buhar basıncı [Yöntem A.4] ve Henry Kanunu Sabiti,
— su içinde ve karanlıkta kimyasal kararlılık (hidroliz) [Yöntem C.7].

Suda az çözünebilen maddeler deniz suyu içinde test edildiğinde, log (S/S') = Ks Cm, ifadesiyle tanımlanan tuzla çökeltme sabitini, Ks 'yi (ya da Setschenow sabiti) bilmek faydalı olabilir. Bu ifadede, S ve S' sırasıyla taze su içinde ve deniz suyundaki çözünürlük, Cm ise molar tuz derişimidir.

Eğer 'askıda tortu testi' yürütülür ise aşağıdaki bilgi mevcut olmalıdır:
— n-oktanol/su dağılım katsayısı [Yöntem A.8],
— yüzeye tutunma katsayısı [Yöntem C.18].

Aşağıdaki bilgiler de faydalı olabilir:
— eğer biliniyor ya da tahmin ediliyor ise çevresel ortam derişimi,
— test maddesinin mikroorganizmalara toksisitesi [Yöntem C.11],
— hazır ve/veya doğal biyobozunurluk [Yöntem C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],
— katı ve tortu/su dönüşüm çalışmalarındaki oksijenli ya da oksijensiz biyobozunurluk [Yöntem C.23, C.24].

1.6. Referans Madde

Oksijenli ortamda kolayca bozunan bir madde (örn. anilin ya da sodyum benzoat) referans madde olarak kullanılmalıdır. Anilin ve sodyum benzoatın bozunması için beklenen zaman aralığı genellikle 2 haftadan daha azdır. Referans maddelerin kullanım amacı, test suyunun mikrobiyal aktivitesinin belirli sınırlarda olmasını sağlamaktır, örneğin; aktif bir mikrobiyal popülasyon içeren su.

1.7. Kalite Kriteri

1.7.1. Geri kazanım

Bir test maddesinin eklenmesinden hemen sonra, herbir başlangıç test derişimi, 14C aktivitesinin ölçümleri ya da işaretlenmemiş maddeler olması durumunda, en az iki ortak örnek kullanılan kimyasal analizle doğrulanmalıdır. Bu, analitik yöntemin ya da test maddesi dağıtımının uygulanabilirliği ve tekrarlanabilirliği hakkında bilgi sağlar. Telafi edilen soğurma ya da dozlama hatalarından dolayı kayıplar için genel olarak ölçülmüş başlangıç 14C aktivite ya da test maddesi derişimi, nominal derişimden ziyade sonraki analizlerde kullanılır. 14C olarak işaretlenmiş test maddesi için deneyin sonundaki geri kazanım seviyesi kütle denkliği olarak verilir (bakınız başlık 1.8.9.4, son paragraf). İdeal olarak, radyoaktif olarak işaretlenmiş kütle denkliği %90 ila %110 arasında olmalı iken, analitik doğruluk radyoaktif işaretlenmemiş test maddelerinin %70 ila %110 arasında başlangıç gerikazanımını sağlamalıdır. Bu aralıklar hedefler olarak yorumlanmalı ve testin kabul edilebilirliği için kriter olarak kullanılmamalıdır. İsteğe bağlı olarak analitik doğruluk, başlangıç derişiminden daha düşük bir derişimde test maddesi için ve ana dönüşüm ürünleri için tayin edilebilir.

1.7.2. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve hassaslığı

Test maddesini nicel olarak değerlendirmek için, uygun durumlarda, analitikyöntemin tekrarlanabilirliği (başlangıçtaki özütlemenin verimliliğini içeren) ve dönüşüm ürünleri, yüzey sularının farklı özütlerinin beş tekrar analizi ile doğrulanmalıdır.
Test maddesi ve dönüşüm ürünleri için analitik yöntemin saptama sınırı (LOD), eğer mümkün ise test sistemine uygulanan başlangıç miktarının en az %1'i kadar olmalıdır. Miktar tayin sınırı (LOQ), uygulanan derişimin %10'una eşit ya da %10'undan daha az olmalıdır. Sıklıkla, birçok organik maddenin kimyasal analizi ve bunların dönüşüm ürünleri, test maddesinin oldukça yüksek derişimde (örneğin > 100 µg/L'de) uygulanmasını gerektirir.

1.8. Test Yönteminin Açıklaması

1.8.1. Ekipman

Test, silikon ya da kauçuk tıpa ile kapatılmış uygun kapasiteli (örn. 0,5 ila 1,0 litre) koni veya silindir biçimindeki şişelerde ya da sıkı CO2 kapaklı serum şişesi (örn. bütil kauçuk septa ile)

içerisinde yürütülebilir. Testi uygulamak için bir diğer seçenek çoklu şişeler kullanmak ve her numune aralığında en az iki kopyada bütün şişelerden ürün almaktır (bkz. başlık 1.8.9.1, son paragraf). Radyoaktif olarak işaretlenmemiş uçucu olmayan test maddeleri için, sıkı gaz tıkaçları ya da kapakları gerekmez; havadan kirlenmeyi engelleyen uygun bir gevşek pamuk tıkaç kullanılır (bkz. başlık 1.8.9.1). Az uçucu maddeler biyometre türü bir sistemde, yüzey suyunu nazikçe karıştırma ile test edilmelidir.

Bakteriyel bir bozulma meydana gelmediğinden emin olmak için, kaplar kullanımdan önce, isteğe bağlı olarak ısıtılabilir ya da otoklavla sterilize edilebilir. Buna ek olarak aşağıdaki standart laboratuvar ekipmanı kullanılır:

— test şişelerinin sürekli uyarılması için sallama masası veya manyetik karıştırıcı,
— santrifüj,
— pH metre,
— nefelometrik bulanıklık ölçümleri için bulanıklıkölçer,
— kuru ağırlık tayinleri için fırın ya da mikrodalga,
— membran filtrasyon düzeneği,
— cam eşyaların sterilizasyonu için otoklav ya da fırın,
— 14C işaretlenmiş maddelerin tutulması için gereken gereçler,
— CO_2 tutan çözeltilerinden ve gerekir ise tortu numunelerinden 14C aktivitesini nicel değerlendirmek için gerekli ekipman,
— eğer özel bir kimyasal analiz kullanılır ise (örneğin gaz kromatografisi, yüksek basınç sıvı kromatografisi) test (ve referans) maddesinin tayini için analitik ekipman.

1.8.2. Test maddesinin stok çözeltileri

Test maddelerinin ve referans maddelerin stok çözeltilerini hazırlamak için deiyonize edilmiş su kullanılır (bkz. başlık 1.8.7, ilk paragraf). Deiyonize edilmiş su, mikroorganizmalara toksik olabilecek maddeler içermemeli ve çözünmüş organik karbon (DOC) 1 mg/L'den fazla olmamalıdır (6).

1.8.3. Yüzey suyunun toplanması ve taşınması

Yüzey suyunun toplanması için numune alanı, belirlenmiş durumdaki bir testin amacına uygun bir şekilde seçilmelidir. Numune alanlarının seçiminde olası tarımsal, endüstriyel ya da evsel katkılar göz önünde bulundurulmalıdır. Sucul ortamın, test maddesi ya da önceki dört yıl içerisinde test maddesine yapısal olarak benzer maddeler ile kirlendiği biliniyor ise ve eğer önceden maruz bırakılmış alanlardaki bozunma hızının araştırması araştırmacının kesin amacı değil ise bu ortam test suyunun toplanması için kullanılmamalıdır. Suyun pH derecesi ve sıcaklığı, toplama alanında ölçülmelidir. Buna ek olarak numune alma derinliği ve su numunesinin görünümü (örneğin renk ve bulanıklık) dikkate alınmalıdır (bkz. başlık 3). Oksijen derişimi ve/veya su içerisindeki ve tortu yüzey katmanındaki yükseltgenme-indirgenme potansiyeli, eğer alanın görünümü ve var olan deneyimler değerlendirme için yetersiz ise, oksijenli koşulları göstermek amacıyla ölçülmelidir. Yüzey suyu, iyi temizlenmiş kap ile taşınmalıdır. Taşıma esnasında numune sıcaklığı, test sıcaklığını önemli derecede geçmemelidir. Eğer taşıma 2 ila 3 saati geçer ise 4 °C'ye kadar soğutma tavsiye edilir. Su numunesi dondurulmamalıdır.

1.8.4. Yüzey suyunun depolanması ve hazırlanması

Test, tercihen numune alındıktan sonra bir gün içerisinde yapılmalıdır. Su depolanması minimize edilmeli ve her ne koşulda olursa olsun maksimum 4 haftayı geçmemelidir. Su numunesi, kullanılacağı ana kadar oksijenlenme ile 4 °C'de korunmalıdır. Kullanımdan önce kaba parçacıklar uzaklaştırılmalıdır, örneğin 100 µm gözenekli naylon filtresi veya kaba kağıt filtresi ile veya çökeltme yoluyla süzerek.

1.8.5. Tortu ile karıştırılmış su hazırlanması (isteğe bağlı)

Süspansiyon elde etmek amacıyla doğal su (kaba partikülleri çıkarmak için filtre edilmiş, bkz başlık 1.8.4) içeren şişelere eklenmiş durumdaki askıda tortu testi için, askıdaki katıların derişimi 0,01 ve 1 g/L arasında olmalıdır. Yüzey tortusu, alınan su numunesi ile aynı alandan gelmelidir. Belirli sucul ortama bağlı olarak, yüzey tortusu ya yüksek organik karbon muhtevası (%2,5 – %7,5) ve ince yapı ile karakterize edilir ya da düşük organik karbon muhtevası (%0,5 - %2,5) ve kaba yapı ile karakterize edilir (3). Yüzey tortusu şu şekilde hazırlanır: saydam plastik bir tüp kullanarak birçok tortu parçacığı özütlenir, numunelendikten hemen sonra aerobik üst katmanlar (yüzeyden maksimum 5 mm daha derinlikteki) ayrıştırılır ve bir araya toplanır. Sonuçta oluşan tortu numunesi, oksijenli koşullar (taşıma 2 ila 3 saati geçer ise 4 °C'ye kadar soğutulur) altında tortuyu korumak için büyük bir hava üst katmanı ile kap içerisinde taşınır. Tortu numunesi, 1:10 oranında test suyu içinde askıya alınmalı ve kullanılana kadar oksijenle 4 °C'de korunmalıdır. Eğer gerekir ise tortu depolaması minimize edilmeli ve her ne şartla olursa olsun maksimum 4 haftayı geçmemelidir.

1.8.6. Yarı sürekli işlem (isteğe bağlı)

Eğer ölçülebilir test maddesinin önemli derecede bozunmasından önce uzun gecikme süresi meydana gelir ise uzatılmış inkübasyon (birkaç ay) gerekli olabilir. Bu durum önceki testlerden biliniyor ise, test suyunun ya da süspansiyonun bir kısmının periyodik yenilenmesine izin veren yarı kesikli yöntem kullanarak test başlatılabilir (bkz. Ek-II). Eğer yarı sürekli işlem kullanarak yapılan testin yaklaşık 60 günü boyunca hiçbir test maddesi bozunmuyorsa normal kesikli test, yarı sürekli teste dönüşebilir (bkz. başlık 1.8.8.3, ikinci paragraf).

1.8.7. Test maddesi veya referans ilavesi

Suda iyi çözünen (> 1 mg/L) az uçucu (Henry kanunu sabiti < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ or <10–5 $atm \cdot m^3/mol$) maddeler için deiyonize edilmiş su içinde stok çözelti hazırlanabilir (başlık 1.8.2); istenen derişime ulaşmak için test kaplarına uygun hacimde stok çözelti eklenir. Herhangi bir eklenmiş stok çözelti hacmi, pratik minimuma bağlı tutulmalıdır (eğer mümkün ise son sıvı hacminin < %10'u). Diğer bir işlem organik çözücüleri daha yüksek hacimde test suyu içinde çözmektir. Bu, organik çözücü kullanımına bir alternatif olarak değerlendirilebilir.

Mecbur kalınan durumlarda, suda az çözünen uçucu olmayan maddelerin stok çözeltileri, uçucu organik çözücü kullanımıyla hazırlanabilir fakat test sistemine eklenen çözücü miktarı hacimce %1'i geçmemeli ve mikrobiyal aktiviteler üzerinde yan etkisi olmamalıdır. Çözücü, su içindeki test maddesinin kararlılığını etkilememelidir. Çözücü, test suyunun ya da süspansiyonun DOC derişimini önemli derecede azaltmaması için çok küçük miktarlarda

olmalıdır. Bu maddeye özgü analiz veya eğer mümkün ise DOC analiziyle kontrol edilebilir (6). Kesinlikle gerekli olan husus bir yere taşınan çözücü miktarını sınırlamak ve nihai test suyu hacminde çözünebilen test maddesinin miktarını sağlamak için gerekli önlemler almaktır. Test maddesini, test kaplarının içine yerleştirmek için (7) ve (8) de tanımlanmış olan diğer teknikler kullanılabilir. Bir organik çözücü, test maddesi uygulaması için kullanıldığında, test suyunu (ilavesiz) içeren çözücü kontrolleri ve eklenmiş referans madde içeren test suyu çözücü taşıyıcıdaki test maddesi ile değiştirilmiş test kaplarını aktif hale getirmeye benzer şekilde muamele edilmelidir. Çözücü kontrollerin amacı, referans maddenin bozunması olarak belirtilen mikrobiyal popülasyon doğrultusunda çözücüden kaynaklanan olası yan etkiyi belirlemektir.

1.8.8. Test koşulları

1.8.8.1. Test sıcaklığı

İnkübasyon, sıcaklık alanı ya da standart sıcaklık 20-25 °C olabilecek olan kontrollü (± 2 °C) sıcaklıkta, karanlık (tercih edilen) ya da dağınık ışıkta meydana gelir. Ortam sıcaklığı ya numune alma sürecinde numunenin gerçek sıcaklığı ya da numune alma ortamındaki ortalama alan sıcaklığı olabilir.

1.8.8.2. Çalkalama

Süspansiyon içindeki partikülleri ve mikroorganizmaları elde etmek için sürekli sallama veya karıştırma anlamına gelen çalkalama işlemi gerçekleştirilmelidir. Çalkalama, oksijenli ortamın oluşturulması için üst katmandan sıvıya oksijen taşınmasına olanak sağlar. Şişeler sallama masasının (yaklaşık 100 rpm çalkalama) üzerine yerleştirilir ve manyetik karıştırma kullanılır. Çalkalama sürekli olmalıdır. Bununla birlikte, homojen süspansiyon korunurken çalkalama ya da karıştırma mümkün olduğunca nazik bir şekilde olmalıdır.

1.8.8.3. Test süresi

Test süspansiyonunun periyodik olarak yenilenmesini içeren yarı sürekli yöntem uygulandığı durumlar hariç, test süresi normal olarak 60 günü geçmemelidir (bkz. başlık 1.8.6 ve Ek-II). Bununla birlikte, eğer test maddesinin bozunması ilk 60 gün içinde başlar ise, kesikli test için test süreci maksimum 90 güne kadar uzatılabilir. Uygun zaman aralıklarında artık 14C aktivitesinin ya da dönüşmüş 14CO2 (bakınız başlık 1.8.9.4) tayiniyle ve/veya kimyasal analizle (başlık 1.8.9.5) bozunma izlenebilir. İnkübasyon süresi, bozunma sürecini değerlendirmek için yeterince uzatılmalıdır. Bozunmanın miktarı, yavaş bozunabilen maddeler için tercihen %50'yi geçmelidir, kinetik bozunma hız sabitini karşılamak için bozunma miktarı yeterli olmalıdır (normal olarak %20 bozunmadan daha büyük).

Eğer aynı ortamdan toplanmış su ve tortu numuneleri ile yapılan benzer testlerden elde edilen deneyimler bu gibi ölçümlerin gerekli olduğunu gösteriyorsa, test sisteminde pH ve oksijen derişimi ölçümleri periyodik olarak yapılmalıdır. Bazı koşullar altında, su ya da tortu içinde çok daha yüksek derişimlerde birincil substratların metabolizması, test esnasında koşulları önemli derecede değiştirmek için yeterli CO2 dönüşümüne ve oksijen tükenmesine neden olabilir.

1.8.9. İşlem

1.8.9.1. Pelajik test için şişelerin hazırlanması

Şişe hacminin üçte birine kadar ve 100 ml'den az olmayacak şekilde uygun hacimdeki test suyu, test şişelerine transfer edilir. Eğer çoklu şişeler kullanılır ise (her numuneleme sürecinde şişelerin tamamından ürün almak için izin veren) küçük numune hacimleri, gecikme fazı uzunluğunu etkileyebileceği için test suyunun uygun hacmi yaklaşık 100 ml olur. Bölüm 1.8.2 ve 1.8.7'de tanımlanan stok çözeltiden test maddesi eklenir. Bozunma kinetiklerinin tayinini yapmak ve kinetik bozunma hız sabitini hesaplamak amacıyla test maddesinin 5 ila 10 faktörle değişen en az iki farklı derişimi kullanılmalıdır. Her iki seçilmiş derişim de 100 µg/L'den az ve tercihen 1-10 µg/L aralığından küçük olmalıdır.

Şişeler, hava ve CO_2 geçirmeyen kapak ve tıkaçlar ile kapatılır. 14C olarak işaretlenmemiş uçucu olmayan test kimyasalları için hava kaynaklı kirlenmeyi engelleyen gevşek pamuk yün tıkaçlar, uçucu olmayan herhangi bir ana bozunma ürünü olmak kaydıyla ve eğer dolaylı yolla CO2 tayini kullanılıyor ise (bkz. Ek-III) uygundur (bkz. Başlık 1.8.1).

Seçilen sıcaklıkta şişeler inkübe edilir (bkz. başlık1.8.8.1). Testin başlangıcında kimyasal analiz için ya da 14C ölçümleri için (örneğin biyolojik bozunma başlamadan önce; bkz. başlık 1.7.1) ve daha sonra uygun zaman aralıklarında ve test sürecinin başlangıcında numuneler geri alınır. Numuneleme, alt numunelerin her tekrardan geri alınmasıyla (5 ml alikot) ya da her numuneleme sürecinde tüm şişelerden ürün alarak uygulanabilir. Test maddesinin mineralizasyonu, ya doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenebilir (bkz. Ek-III). Çabuk bozunabilen maddeler için yeterli olan üç numuneleme noktası doğrulanamaz ise güvenilir hız sabiti tahmini yapmak amacıyla bozunma fazı esnasında (örneğin. gecikme fazı sonlandıktan sonra) genellikle minimum beş numuneleme noktası gerekir. Bozunma fazı esnasında çabuk bozunamayan maddeler için kolaylıkla daha fazla ölçüm yapılabilir ve bununla birlikte "k" tahminini yapmak için daha fazla veri noktası kullanılmalıdır. Bozunma yavaş ise haftada bir numuneleme yapılması tavsiye edilmiş olsa da, biyobozunma hızı değişken olduğundan, numuneleme için belirli bir zaman çizelgesi tayin edilemez. Eğer test maddesi hızlı bozunabilir ise, ilk üç günde, günde bir kez daha sonra ise iki ya da üç günde bir kez numuneleme yapılır. Belirli koşullar altında, çok çabuk hidrolize olan maddeler ile örneğin, saat başı numuneleme gerekli olabilir. Uygun numuneleme aralıklarının tayinini yapmak amacıyla testten önce ön çalışmalar yapılması tavsiye edilir. Eğer numuneler daha özel analiz için mevcut ise, daha fazla numune alınması ve geriye doğru stratejiyle, deneyin bitiminde analiz edilecek olanların seçilmesi tavsiye edilir, örneğin en son numunelerin ilk olarak analiz edilmesi gibi (depolama esnasında numunelerin kararlılığı hakkında bilgi için bkz. başlık 1.8.9.5, ikinci paragraf).

1.8.9.2. Şişelerin ve numunelerin sayısı

Yeterli sayıdaki test şişelerini belirlemek için olması gerekenler:
— test şişeleri; her numuneleme süresinde bütün şişelerden ürün alınmış ise (FT şeklinde sembolize edilir), test maddesinin her bir derişimi için en az bir yedeği olan test şişesi (tercihen en az 3) ya da her derişim için çoklu test şişesi,
— kütle denkliği hesaplaması için test şişeleri; her bir test derişimi için en az bir yedeği olan şişe (FM şeklinde sembolize edilir),
— kör kontrol, test maddesi yok; sadece test suyunu içeren en az bir kör test şişesi(FB şeklinde sembolize edilir),

— referans kontrolü; referans madde içeren en az bir yedeği olan test şişesi (örn. anilin ya da sodyum benzoat, 10 µg/l'de) (FC şeklinde sembolize edilir). Referans kontrolün amacı, minimum mikrobiyal aktiviteyi teyit etmektir. Eğer uygun ise test maddesinin bozunması kimyasal analizle görüntülendiğinde, radyoaktif olarak işaretlenmiş referans madde kullanılabilir,
— steril kontrolü; olası abiyotik bozunmayı ya da test maddesinin diğer biyolojik olmayan artıkları tetkik etmek için sterilize edilmiş test suyu içeren bir ya da iki test şişesi (FS ile sembolize edilir). Biyolojik aktivite, test suyunu otoklavlayarak (121 °C; 20 dk.) ya da bir toksik madde (e.g. 10-20 g/l'de sodyum azid (NaN_3), 100 mg/l'de civa klorür ($HgCl_2$) ya da 100 mg/l'de formalin) ekleyerek veya gama ışıması ile durdurulabilir. Eğer $HgCl_2$ kullanılır ise, zehirli atık olarak imha edilmelidir. Büyük miktarda tortu eklenmiş su için, steril koşulları elde etmek kolay değildir; tekrarlanan otoklavlama (örn. üç kere) tavsiye edilir. Tortunun soğurulma karakteristiğinin, otoklavlama ile değiştirilebileceğini dikkate almak gerekir.
— çözücü kontrolleri, test suyu ve referans madde içeren test suyu içerir; aynı prosedür kullanılan ve test maddesine uygulanan miktarda çözücü ile işlem görmüş yedeklenmiş şişeler. Amaç referans maddenin bozunma tayinini yaparak çözücünün olası yan etkilerini tetkik etmektir.

Testin tasarımında, araştırmacı, arttırılmış numuneleme zamanlarına karşı arttırılmış deneysel tekrarın göreceli önemini göz önünde bulundurmalıdır. Gerekli olan şişelerin tam sayısı, bozunma ölçümü için kullanılan yönteme bağlı olacaktır (bkz. başlık 1.8.9.1, üçüncü paragraf; başlık 1.8.9.4 ve Ek-III).

İki alt numune (örn. 5 ml alikot), her numuneleme sürecinde test şişesinden geri alınmalıdır. Eğer bütün şişelerden ürün alınmasına izin vermek için çoklu şişeler kullanılır ise her numuneleme sürecinde minimum iki şişe gözden çıkarılmalıdır (bkz. başlık 1.8.9.1, ilk paragraf).

1.8.9.3. Askıda test için şişelerin hazırlanması [isteğe bağlı]

Eğer gerekir ise test suyunun ve tortunun gerekli olan miktarı, test kaplarına eklenir (bkz. başlık 1.8.5). Askıda tortu testi için şişelerin hazırlanması, pelajik test için yapılan hazırlık ile aynıdır (bkz. başlık 1.8.9.1 ve 1.8.9.2). Tercihe bağlı olarak serum şişeleri ya da yassı şişeler kullanılır. Kapalı durumdaki şişeleri yatay bir şekilde çalkalayıcı üzerine yerleştirilir. Açık olarak 14C işaretlenmemiş, uçucu olmayan maddeler için açık olan şişeler dik bir pozisyonda yerleştirilmelidir, bu durumda manyetik karıştırma ve camla kaplanmış mıknatıs çubuğu kullanılması tavsiye edilir. Gereken hallerde düzenli oksijenli koşulları sağlamak için şişeler havalandırılır.

1.8.9.4. Radyokimyasal tayinler

Mevcut $14CO_2$, doğrudan ya da dolaylı olarak ölçülür (bkz. Ek-III). $14CO_2$, test suyundaki veya süspansiyondaki başlangıç 14C aktivitesi ile örneğin pH 2-3'e kadar asitlendirilmesinden ve CO_2 uzaklaştırılmasından sonraki örnekleme zamanındaki toplam artık aktivitesinin farkına bakılıp dolaylı olarak tayin edilir. Böylece inorganik karbon uzaklaştırılır ve organik maddeden ölçülen artık aktivitesi elde edilir. Eğer test maddesi dönüşümü esnasında ana uçucu dönüşüm ürünleri biçimlenir ise, dolaylı $14CO_2$ tayini kullanılmalıdır (bkz. Ek-III). Mümkün ise $14CO_2$ varlığı, numuneleme sürecinde en az bir test şişesinde doğrudan ölçülmelidir (bkz. Ek-III); bu prosedür hem kütle denkliğinin hem de

biyobozunma sürecinin kontrol edilmesine olanak sağlar, fakat kapalı şişeler ile test yapılması kısıtlanmıştır.

Mevcut $14CO_2$ test süresince doğrudan ölçüldüğünde, test başlangıcında daha fazla test şişesi tahsis etmek gerekebilir. Ana uçucu dönüşüm ürünleri test maddesinin dönüşümü esnasında oluşur ise, doğrudan $14CO_2$ tayini tavsiye edilir. Her bir ölçüm noktasında test şişeleri pH 2-3'e kadar asitlendirilir ve $14CO_2$ iç veya dış bir absorblayıcıya yönlendirilir (bkz. Ek-III).
İsteğe bağlı olarak 14C işaretlenmiş test maddesi derişimleri ve ana dönüşüm ürünlerinin tayini, radyokromatografi (örn. ince katman kromatografisi, RAD-TLC) ya da radyokimyasal tayin kullanarak yapılabilir.

İsteğe bağlı olarak kalan radyoaktivitenin, artık test maddesinin ve dönüşüm ürünlerinin faz dağıtımı (bkz. Ek-I) tayini yapılabilir.

Testin bitiminde kütle denkliği tayini, test esnasında numune alınmamış ayrı test şişeleri kullanılarak doğrudan $14CO_2$ ölçümüyle yapılmalıdır (bkz. Ek-III).

1.8.9.5. Özel kimyasal analizi

Eğer hassas bir özel analitik yöntem mevcut ise, radyoaktif olarak işaretleme tekniğini kullanmak yerine test maddesinin toplam artık derişimini ölçerek birincil biyobozunma değerlendirilebilir. Eğer radyoaktif olarak işaretlenmiş test maddesi kullanılır ise (toplam mineralizasyonu ölçmek için), kullanışlı ek bilgi sağlamaya ve prosedürü kontrol etmeye paralel olarak özel kimyasal analizleri gerçekleştirilebilir. Test maddesinin bozunması esnasında biçimlenmiş dönüşüm ürünlerini ölçmek için özel kimyasal analizleri kullanılabilir ve bu 60 günü geçen yarı ömre sahip mineralize olmuş maddeler için tavsiye edilir. Test maddesi derişimi ve dönüşüm ürünleri, her numuneleme sürecinde ölçülmeli ve rapor edilmelidir (uygulanan derişim ve yüzde olarak). Genellikle uygulanan derişimin $\geq$ %10'unda herhangi bir numuneleme sürecinde saptanan dönüşüm ürünleri, eğer makul bir şekilde gerekçelendirilmez ise tanımlanmalıdır. Çalışma esnasında sürekli olarak artan derişimler için olan dönüşüm ürünleri de, derişimleri yukarıda verilen limiti aşmasa bile, bir kalıcılık ifade edebileceğinden tanımlamada dikkate alınmalıdır. Eğer test maddesinin hızlı abiyotik dönüşümü (örn. hidroliz) mümkün olduğu düşünülür ise steril kontrollerdeki dönüşüm ürünlerinin analizleri göz önünde bulundurulmalıdır. Dönüşüm ürünlerinin nicel olarak değerlendirilmesine ve tanımlanmasına olan ihtiyaç durum bazında değerlendirilmeli ve gerekçeleri raporda yer almalıdır. Organik çözücü ile özütleme teknikleri, ilgili analitik prosedüre uygun olarak uygulanmalıdır.

Eğer analiz 24 saat (tercih edilen) içinde gerçekleştirilecek ise bütün numuneler, 2 ila 4 °C'de ve hava geçirmez şekilde depolanmalıdır. Daha uzun süreli depolama için numuneler – 18 °C'nin altında bir ısıda dondurulmalı ya da kimyasal olarak korunmalıdır. Asitlendirme numuneleri korumak için tavsiye edilen bir yöntem değildir, çünkü asitlenmiş numuneler kararlı değildir. Eğer numuneler 24 saat içinde analiz edilmeyecek ve daha uzun süre depolanacaksa – 18 °C depolama ve muhafaza koşulları altında, kimyasalların kararlılığını göstermek için depolama kararlılık çalışması yürütülür. Eğer analitik yöntem çözücü özütlemesi ya da katı faz özütlemesi (SPE) içerir ise özütleme numunelemeden hemen sonra veya numunenin maksimum 24 saat soğutulmasından sonra uygulanmalıdır.

Analitik yöntemin hassasiyetine bağlı olarak, başlık 1.8.1'de belirtilen hacimden daha büyük numune hacmi gerekli olabilir. Test, yaklaşık olarak 100 mililitrelik numuneler toplamayı mümkün kılan, 2-3 litre hacim kapasiteli şişelerde 1 litre hacim kullanılarak kolayca yürütülebilir.

2. VERİ VE RAPORLAMA

2.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

2.1.1. Veri grafiği çizimi

Eğer madde, çabuk bir şekilde önemli miktarda bozunmuyorsa; numuneleme zamanları, günlerin tam sayısına değil saatin tam sayısına tamamlanır. Test maddesinin (14C işaretlenmiş maddeler için) ya da artık derişimin (işaretlenmemiş maddeler için) artık aktivite tahminleri, hem çizgisel hem de yarı logaritmik olarak zamana karşı grafiğe aktarılır (bkz. Şekil 1a ve 1b). Eğer bozunma gerçekleşir ise FS şişeleri ile FT şişeleri sonuçları karşılaştırılır. Eğer test maddesi (FT) ve steril şişelerden (FS) elde edilen sonuçların ortalaması %10'dan daha az bir sapma gösterir ise, gözlemlenen bozunmanın büyük bir olasılıkla abiyotik olduğu varsayılabilir. Eğer FS şişelerindeki bozunma daha az ise, biyobozunmanın boyutunu tahmin etmek amacıyla FT'den (çıkarmayla) elde edilenleri düzeltmek için şekiller kullanılabilir. Ana dönüşüm ürünleri için isteğe bağlı olan analizler uygulandığında, test maddesi azalmasının çizimine ek olarak oluşumlarının çizimi ve azalması da gösterilmelidir.

Gecikme faz süreci tL, doğrusal bölümün 0'a ekstrapole edilmesi ile bozunma eğrisinden (yarı logaritmik grafik çizimi) veya yaklaşık %10'unun bozunduğu zamanın tayin edilmesinden tahmin edilir (bkz. Şekil 1a ve 1b). Yarı logaritmik grafik çiziminden, birinci dereceden hız sabiti, "k" ve bunun zamana karşı ln (artık 14C aktivitesi ya da artık madde konsantrasyonu) çizgisel regresyonuyla standart hata tahmin edilir. Özellikle 14C ölçümleri ile gecikme fazı bitiminden sonra sadece eğimin başlangıç çizgisel kısmına bağlı veri kullanılır ve daha büyük miktarda daha belirsiz veri yerine az ve temsili veri seçmek için tercih sunulur. Belirsizlik ölçülmüş artık 14C aktivitelerinin tavsiye edilen doğrudan kullanımından gelen içsel hataları içerir (aşağı bakınız). Eğer bozunma çiftfazlı ise, bu iki farklı hız sabiti hesaplanması ile ilgili olabilir. Bu nedenle bozunma eğrisinin iki farklı fazı tanımlanır. Alt numuneler aynı şişeden çıkarıldığında, ya da bütün şişelerden her numunelemede ürün çıkarıldığında ortalama değerler kullanarak hız sabiti "k" ve yarı ömür $t½ = ln2/k$ hesaplamaları her bir tekrar tüpü için yapılmalıdır (bkz. Başlık 1.8.9.2, son paragraf). İlk prosedür uygulandığında, hız sabiti ve yarı ömür, her ayrı tekrar için ve bir standart hata ile ortalama değer olarak rapor edilmelidir. Eğer test maddesinin yüksek derişimleri kullanılmış ise bozunma eğrisi, düz çizgiden (yarı logaritmik çizim) epey sapabilir ve birinci dereceden kinetikler geçerli olmayabilir. Buna bağlı olarak bir yarı ömrü tanımlamanın hiçbir anlamı olmayabilir. Bununla birlikte sınırlı veri aralığı için psödo birinci dereceden kinetikler uygulanabilir ve yarı ömür DT50 bozunması (bozunmanın %50'sine ulaşmak için geçen zaman) tahmin edilebilir. Ancak seçilmiş veri aralığına bağlı bozunma sürecinin, verilen veri grubunun sadece tanımlayıcısı olan DT50'yi kullanarak önceden bildirilemeyeceği de bilinmelidir. İstatiksel hesaplamaları ve eğri düzenlenmesini kolaylaştırmak için analitik araçlar kolayca kullanılabilir ve bu tür bir yazılımın kullanılması tavsiye edilir.

Eğer özel kimyasal analizleri yapılır ise yukarıdaki toplam mineralizasyon gibi birincil bozunma için hız sabitleri ve yarı ömürler tahmin edilir. Eğer birincil bozunma sınırlama prosesi ise, bozunmaya ait tüm alanda yer alan veri noktaları bazen kullanılabilir. Bunun nedeni ölçümlerin, 14C aktivitesinin ölçümlerinin aksine doğrudan olmasıdır.

Eğer 14C işaretlenmiş maddeler kullanılır ise, en azından test bitiminde, uygulanan başlangıç derişimin yüzdesi cinsinden kütle denkliği ifade edilmelidir.

2.1.2. Artık aktivitesi

Organik maddenin 14C işaretlenmiş kısmı biyolojik olarak bozunduğunda, 14C'ün bir kısmı biyokütlenin büyümesinde ve/veya hücre dışı metabolitlerin sentezinde kullanılırken büyük bir kısmı $14CO_2$'ye dönüştürülür. Bununla birlikte maddenin 'nihai' biyobozunmasında, karbonunun %100'ü $14CO_2$'ye dönüşmez. Biyosentez ile oluşmuş ürünlerin içindeki 14C, 'ikincil mineralizasyondan' dolayı sonradan yavaş bir şekilde $14CO_2$ salımı gerçekleştirir. Bu nedenlerden dolayı artık organik 14C aktivitesinin (CO_2 karıştırmasından sonra ölçülen) ya da üretilen $14CO_2$'nin zamana karşı grafiği, bozunma tamamlandıktan sonra 'kuyruklanma' gösterir. Bu, verinin kinetik yorumlamasını karmaşık hale getirir ve bu amaçla sadece eğrinin başlangıç kısmı (gecikme fazı bittikten sonra ve yaklaşık olarak %50 bozunmaya ulaşmadan önce), bozunma hızı sabitinin tahmini için kullanılmalıdır. Eğer test maddesi bozunur ise toplam artık organik 14C aktivitesi, artan bozulmamış test maddesi ile ilgili olan 14C aktivitesinden her zaman daha büyük olur. Eğer test maddesi birinci dereceden reaksiyon ile bozunuyorsa ve ayrım sabiti α CO_2 içine mineralize edilir ise, 14C kaybolma eğrisinin başlangıç eğimi (zamana karşı toplam 14C aktivitesi), ilgili test maddesi (ya da 14C ile işaretlenmiş test maddesi kısmı) derişimi eğrisinin eğiminin α ile çarpımı olacaktır. Doğrulanmamış toplam organik 14C aktivitesinin ölçümleri kullanıldığında buna bağlı olarak hesaplanmış bozunma hız sabiti korunumlu olacaktır. Çeşitli sadeleştirme hipotezine dayalı olarak ölçülmüş radyokimyasal aktivitelerden test maddesi derişiminin tahmini için gereken prosedürler, literatür (2), (9), (10), (11) de açıklanmıştır. Bu gibi prosedürler, çabuk bozunabilen maddeler için oldukça kolay bir şekilde uygulanabilmektedir.

2.2. Sonuçların yorumlanması

Eğer "k", eklenmiş derişimden bağımsız ise (örneğin test maddesinin farklı derişimlerinde hesaplanmış k yaklaşık olarak aynı ise), birinci derece hız sabitinin kullanılan test koşullarının, örneğin test maddesi, su numunesi ve test sıcaklığının, temsili olduğu kabul edilebilir. Sonuçlar ne derecede genellenebilirse ya da ekstrapole edilirse edilsin bir uzman değerlendirmesinden geçirilmelidir. Eğer test maddesinin yüksek derişimi kullanılır ise ve buna bağlı olarak bozunma birinci dereceden kinetikleri izlemez ise veri, birinci dereceden hız sabiti ya da ilgili yarı ömrün doğrudan tahmini için kullanılamaz. Bununla birlikte test maddesinin yüksek derişimi kullanılan bir testten elde edilmiş veri, toplam mineralizasyon derecesini ve/veya dönüşüm ürünlerinin saptanması ve nicel olarak tahmini için kullanışlı olabilir.

Eğer biyobozunma dışındaki diğer kayıp süreçlerinin hızları biliniyor ise (örneğin hidroliz ya da uçuculuk), bunlar biyobozunma hızının yaklaşık olarak tahmini için test esnasında gözlemlenen net kayıptan çıkarılabilir. Hidroliz için veri, örneğin steril kontrolden ya da test maddesi yüksek derişimini kullanan paralel testten elde edilebilir.

Doğrudan ve dolaylı $14CO_2$ tayini (bkz. başlık 1.8.9.4 ve Ek-III), sadece test maddesinin CO_2'ye mineralizasyon boyutunu ölçmek amacıyla kullanılabilir. Radyokromatografi (RAD-TLC) ya da HPLC, 14C işaretlenmiş test maddesi derişimlerinin ve ana dönüşüm ürünleri oluşumunun (bkz. başlık 1.8.9.4, üçüncü paragraf) analizi için kullanılabilir. Doğrudan bir yarı ömür tahmini yapmak için hiçbir ana dönüşüm ürününün (belirlenen uygulanan test maddesi miktarı ≥ %10) olmaması gerekir. Eğer burada belirtildiği gibi ana dönüşüm ürünleri var ise detaylı veri değerlendirmesi gerekli olur. Eğer ana dönüşüm ürünlerinin davranışı, deneyimler ile makul bir şekilde değerlendirilemez (örneğin bozunma için kullanılan yol üzerine bilgi) ise bunlar testin tekrarını ve/veya dönüşüm ürünlerinin tanımlamasını (bkz. başlık 1.8.9.5, birinci paragraf) içerebilir. CO_2'ye çevrilmiş test maddesi karbonunun oranı değişebildiği için (büyük ölçüde test maddesi ve mevcut olan diğer maddelerin derişimine, test koşullarına ve mikrobiyal topluluğa bağlı olarak) bu test, DOC azalan testte olduğu gibi nihai biyobozunmanın doğru tahminine izin vermez fakat sonuç, solunum ölçümü testi ile elde edilenler ile benzerdir. Bu nedenle mineralizasyon derecesi nihai biyobozunmanın minimum seviyesinden daha az ya da bu seviyeye eşit olacaktır. Nihai biyobozunmanın tam görünümünü elde etmek için (mineralizasyon ve biyokütle içine yerleştirme), test bitiminde 14C faz dağıtımının analizi uygulanmalıdır (bkz. Ek-I). Parçacık havuzu içindeki 14C, bakteriyel biyokütle içine yerleştirilmiş 14C'den ve organik parçacıklara emilmiş 14C'den meydana gelecektir.

2.3. Testin geçerliliği

Eğer referans madde beklenen süre içerisinde bozunmaz ise (anilin ve sodyum benzoat için, genellikle iki haftadan az), testin geçerliliği askıya alınır ve daha fazla doğrulanmalıdır, ya da buna alternatif olarak test, yeni su numunesi ile tekrar edilmelidir. Avrupa'da bulunan yedi laboratuvarın ISO dolanım-testinde, anilin için uyumlaştırılmış bozunma hız sabiti 20 °C'de 0,8 $gün^{-1}$ ortalama ile 0,3'ten 1,7 $gün^{-1}$ aralıkta ve ± 0,4 gün–1 ($t½$ = 0,9 gün) standart hata ile değişkenlik göstermiştir. Tipik gecikme süresi 1 ila 7 gündür. İncelenmiş sularda mililitre başına 103 ila 104 koloni oluşum birimi (CFU) bakteriyel biyokütle rapor edilmiştir. Zengin besinli Orta Avrupa sularındaki bozunma hızı, farklı trofik duruma bağlı olarak veya kimyasal maddelere önceden maruz kalmış olabileceğinden dolayı, kuzey oligotrofik sularınkine kıyasla daha büyüktür.
Radyoaktif olarak işaretlenmiş maddeler için deneyin sonundaki geri kazanım (kütle denkliği) %90 ile %110 arasında olması gerekirken, işaretlenmemiş maddeler için deneyin başlangıcındaki başlangıç geri kazanım %70 ile %110 arasında olmalıdır. Bununla birlikte belirlenmiş aralıklar, sadece hedef olarak yorumlanmalı ve testin kabul edilebilirliği için kriter olarak değerlendirilmemelidir.

3. TEST RAPORU

Çalışmanın türü (örneğin pelajik test ya da askıda tortu testi) ve aşağıdaki bilgiler test raporunda açık bir şekilde belirtilmelidir.

Test maddesi ve referans madde(ler):
- genel adları, kimyasal adları (tavsiye edilen IUPAC ve/veya CAS adları), CAS numaraları, yapısal formüller (eğer radyoaktif olarak işaretlenmiş madde kullanılır ise 14C pozisyonunu belirleyen) ve test ve referans maddesinin ilgili fizikokimyasal özellikleri (bkz. başlık 1.5 ve 1.6),

- kimyasal adları, CAS numaraları, yapısal formüller (eğer radyoaktif olarak işaretlenmiş madde kullanılır ise 14C pozisyonunu belirleyen) ve dönüşüm ürünlerinin tanımlanmasında ve nicelik olarak değerlendirilmesinde standart olarak kullanılan maddelerin ilgili fizikokimyasal özellikleri,
- test maddesi ve referans maddelerin saflığı (safsızlığı),
- işaretlenmiş kimyasalın radyokimyasal saflığı ve özel aktivitesi (uygun olduğu yerde).

Yüzey suyu:

Su numunesi için en az aşağıdaki bilgiler sağlanmalıdır:
- eğer mümkün ise kirlilik geçmişini içeren numuneleme alanının yeri ve açıklaması,
- numune alma tarihi ve zamanı,
- besinler (toplam N, amonyum, nitrit, nitrat, toplam P, çözünmüş ortofosfat),
- numuna alma derinliği,
- numunenin görünümü (örneğin renk ve bulanıklık),
- DOC ve toplam organik karbon (TOC),
- Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ),
- numune yeri ve zamanında sıcaklık ve pH,
- oksijen ya da indirgenme-yükseltgenme potansiyeli (sadece oksijenli koşullar belli değil ise gerekli),
- tuzluluk veya iletkenlik (deniz suyu ve tuzlu su olması durumunda),
- askıda katılar (bulanık numune olması durumunda),
- numuneleme sürecinde numuneleme yeri hakkında olası diğer ilgili bilgiler (örneğin, dere ve deniz akımının akış hızı hakkında mevcut ve geçmişteki veri, yakındaki birincil boşaltımlar ve boşaltım türleri, numuneleme zamanından önceki hava koşulları),

ve isteğe bağlı olarak:
- mikrobiyal biyokütle (örneğin, akridin turuncusu doğrudan hesaplama ya da koloni biçimlendirme birimleri),
- inorganik karbon,
- alg biyokütlesi için özel bir tahmin olarak klorofil-a derişimi.

Ayrıca eğer askıda sediman testi yürütülmekte ise sediman hakkındaki aşağıdaki bilgiler sağlanmalıdır:
- sediman alma derinliği,
- sedimanın görünümü (renklendirilmiş, çamurlu, alüvyonlu ya da kumlu),
- yapı (örneğin, % kaba kum, iyi kum, alüvyon ve kil),
- askıda katıların g/l cinsinden kuru ağırlığı, organik madde içeriğinin ölçümü olarak yakmadan kaynaklı ağırlık kaybı veya TOC derişimi,
- pH,
- oksijen ya da indirgenme-yükseltgenme potansiyeli (sadece oksijenli koşullar belli değil ise gerekli),

Test koşulları:

- laboratuvar testlerinde, numune depolamada, numunenin ön muamelesinde, çalışmaların performans tarihinde toplanan ve kullanılan arasındaki gecikme,
- uygulanan test maddesi, test derişimi ve referans madde miktarı,
- katıların herhangi bir kullanımını da içeren test maddesi uygulamasının yöntemi,
- kullanılan yüzey suyunun ve tortunun hacmi ve (eğer kullanılır ise) analiz için her aralıkta numunelenmiş hacim,

Eğer karanlık koşullar sağlanamaz ise, 'dağıtılmış ışık' koşulları hakkında bilgi:

- steril kontrollerin kurulması için kullanılan yöntem(ler) hakkında bilgi (örneğin, otoklavlamaların sıcaklığı, zamanı ve miktarı),
- inkübasyon sıcaklığı,
- radyokimyasal ölçümler ve kütle denkliği kontrolü ve faz dağıtımı (eğer yürütülmüş ise) için kullanılan analitik teknik ve yöntem(ler) hakkında bilgi,
- yedekleme sayısı.

Sonuçlar:

- geri kazanım yüzdeleri (bkz. başlık 1.7.1),
- tayin sınırı (LOD) ve nicel değerlendirme sınırını (LOQ) içeren analitik yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti (bkz. başlık 1.7.2),
- tablo biçiminde bütün ölçülmüş veri (numuneleme zaman noktalarını içeren), hesaplanmış değerler ve bozunma eğrileri; her test derişimi ve her tekrar şişesi için, logaritmik çizimin eğimi, tahmin edilen gecikme süresi ve birinci derece ya da psödo birinci derece hız sabiti (eğer mümkün ise) ve ilgili bozunma yarı ömrü (ya da yarı ömür periyodu, t50) için doğrusal korelasyon katsayısı rapor edilir,
- ayrı tekrarlarda gözlemlenen sonuçların ortalaması olarak ilgili değerler rapor edilir, örneğin, gecikme süresinin uzunluğu, bozunma hızı sabiti ve bozunma yarı ömrü (ya da t50),
- bozunma eğrisinin görünümüne ve test derişimlerinin olası etkisine dayanarak değerlendirmek için adapte olmuş ya da olmamış olarak sistem kategorizasyonu,
- nihai kütle denkliği kontrolünün sonuçları ve (eğer var ise) faz dağılımının sonuçları,
- mineralize edilmiş 14C dağılımı ve eğer özel analizler kullanılmış ise birincil bozunmanın nihai seviyesi,
- tanımlama, molar derişim ve eğer uygun ise uygulanan ve ana dönüşüm ürünlerinin yüzdesi (bkz. başlık 1.8.9.5, ilk paragraf),
- uygun ise önerilen dönüşüm yolu,

Sonuçların tartışılması.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.
(2) ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.
(3) Testing Yöntem C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.
(4) Testing Yöntem C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.
(5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.
(6) ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).
(7) ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
(8) OECD (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.
(9) Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralisation kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.
(10) Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of 14C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.
(11) ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

Ek- I

14C faz dağılımı

Prosedürü kontrol etmek amacıyla, toplam artık organik 14C aktivitesinin (TOA) rutin ölçümleri, absorblayıcı içinde yakaladıktan sonra, mevcut 14CO2'nin doğrudan tayinini kapsayan kütle denkliği ölçümleri ile desteklenmelidir (bkz. Ek-III). Pozitif 14CO2 oluşumu, uçuculuk ya da emme gibi abiyotik bozunma ya da diğer kayıp mekanizmalarının aksine biyobozunmanın doğrudan kanıtıdır. İlaveten, membran filtre ya da santrifüj ile parçacığın ayrıştırılmasından sonra, biyobozunma davranışını karakterize eden kullanışlı bilgi, çözünmüş hal (çözünmüş organik 14C aktivitesi, DOA) ve parçacıklı hal (parçacık organik 14C aktivitesi, POA) arasındaki TOA dağıtımının ölçümlerinden elde edilebilir. POA, yeni bir gözenekli gerecin sentez için kullanılan ve dolayısıyla parçacık biyokütle dağılımının içine dahil edilen test maddesi karbonuna ek olarak, mikrobiyal biyokütle ve diğer partiküllerin üzerine emdirilmiş test maddesinden meydana gelir. Çözünmüş 14C organik madde oluşumu, biyobozunmanın bitiminde DOA olarak tahmin edilebilir (bozunmaya karşı zaman grafiğindeki düzlük).

Test maddesinin (polikarbonat filtreler belki uygun olabilir) yeterli miktarını emmeyen bir maddenin üzerine 0,22 µm ya da 0,45 µm membran filtresi kullanarak numunelerin süzülmesi ile seçilmiş numuneler içindeki artık 14C faz dağılımı tahmini yapılır. Eğer filtre üzerine test maddesinin emilimi ihmal edilemeyecek kadar büyük ise (deneyden önce kontrol edilmelidir) süzme yerine yüksek hızda santrifüj (2000 g; 10 dk.) kullanılabilir.

Süzülmemiş numuneler için, Ek-III'te tanımlanmış olan süzme ve santrifüj işlemi devam ettirilir. Membran filtreleri uygun sintilasyon sıvısı içinde çözdürülür ve genellikle sönümü doğrulamak için sadece harici standart oran yöntemi kullanarak hesaplanır ya da numune oksitleyici kullanılır. Eğer santrifüj kullanılmış ise damıtılmış suyun 1-2 ml'indeki parçacık dağılımından oluşan topak yeniden askıya alınır ve küçük sintilasyon şişelerine nakil edilir. 1 ml damıtılmış su ile iki kez yıkandıktan sonra yıkama suyu küçük şişeye aktarılır. Eğer gerekli ise sıvı sintilasyon hesaplaması için süspansiyon jel içine yerleştirilir.

Ek - II

Yarı sürekli yöntem

Dirençli maddelerin yeterli derecede bozunmasını sağlamak amacıyla birkaç aya uzatılmış inkübasyon gerekebilir. Normalde, orijinal su numunesinin karakteristiği test süspansiyonunun yenilenmesiyle değişmiyorsa, test süresi 60 günü geçmemelidir. Bununla birlikte eğer test maddesi bozunması ilk 60 gün içerisinde başlar ise test periyodu, test süspansiyonu yenilenmeden 90 güne kadar uzatılabilir.

Uzun periyotlar için inkübasyon esnasında temel besin öğelerinin ve birincil karbon substratların su numunesinin olası kaybından dolayı mikrobiyal topluluğun çeşitliliği azalabilir. Bununla birlikte yavaş bozunan maddelerin bozunma hızının yeterli tayini için yarı sürekli test kullanılması tavsiye edilir. Eğer maddenin %20'nin bozunması için üç aylık bir inkübasyon süreci beklenmekte ise, var olan tecrübelere dayanarak, test yarı sürekli yöntem kullanarak başlatılmalıdır. Alternatif olarak, kesikli yöntem kullanılarak yaklaşık 60 günlük süre içerisinde hiçbir test maddesi bozunmaz ise, kesikli test yarı sürekli test ile değiştirilebilir. Önemli bir bozunma gerçekleştiğinde (örneğin > %20) yarı sürekli yöntem durdurulabilir ve test kesikli deney ile devam ettirilebilir.

Yarı sürekli test içinde, her iki haftada bir yaklaşık test süspansiyonunun üçte bir hacmi, başlangıç derişimlere eklenmiş test maddesine taze eklenmiş su ile yer değiştirir. İsteğe bağlı askıda tortu test uygulanır ise, tortu, başlangıç derişiminin (0,01 ve 1 g/l arasında) değiştirilen suyuna eklenir. Askıda tortu katıları ile test yürüterek suyun yenilenmesi esnasında tamamen askıya alınmış sistemin elde edilmesi ve katı ve sıvılar için kalma süresinin benzer olması önemlidir. Aksi halde, kararsız fazlı homojen sıvı sistemlere benzerlik kaybolabilir. Bu nedenlerden dolayı, yarı sürekli yöntem kullanıldığında, belirli aralıkların düşük seviyelerinde askıda olan sedimanların başlangıç derişimi tercih edilir.

Önceden belirlenmiş test maddesi eklemesi ile, başlangıç test maddesi derişimi, test süspansiyonunun kısmi yenilenmesiyle aşıldığını ve dolayısıyla test maddesinin yüksek derişimleri ile sık görülen adaptasyondan kaçınıldığını gösterir. Prosedür, tükenen besinlerin ve birincil substratların hem yeniden aşılanmasını hem de karşılanmasını içerdiğinden, orijinal mikrobiyal çeşitlilik yenilenir ve prensipte test süresi sonsuza kadar uzatılabilir. Yarı sürekli yöntem kullanıldığında, her yenileme sürecinde eklenmiş ya da çıkarılmış test maddesi miktarları için artık test maddesi derişiminin doğrulanması gerektiğine dikkat etmek önemlidir. Toplam ve çözünmüş test maddesi derişimi, az miktarda emici bileşikler için değiştirilebilir bir biçimde kullanılabilir. Log Kow değeri < 3 olan maddeler için (nötr yağı seven bileşikler için) belirli koşullar altında (0,1-1 g katı/litre) emme önemsizdir(< %5). Bu aşağıdaki hesaplama örneğinde gösterilmektedir. 0,1 g/l katılar litre başına yaklaşık olarak 10 mg karbona tekabül eder (karbon dağılımı, fc = 0,01).

Aşağıdaki kabuller yapıldığında,

Log Kow (test maddesi) = 3
Koc = 0,42 × Kow
Ayrışma katsayısı, Kd = fC × Koc
toplam derişimin çözünmüş dağılımı (C-su (Cw)/C-toplam (Ct):
Cw/Ct = 1/(1 + Kd × SS) = 1(1 + Koc × fC × SS) = 1/(1 + 0,42 × 103 × 0,01 × 0,1 × 10–3) = 0,999 olarak belirlenir.

Ek - III

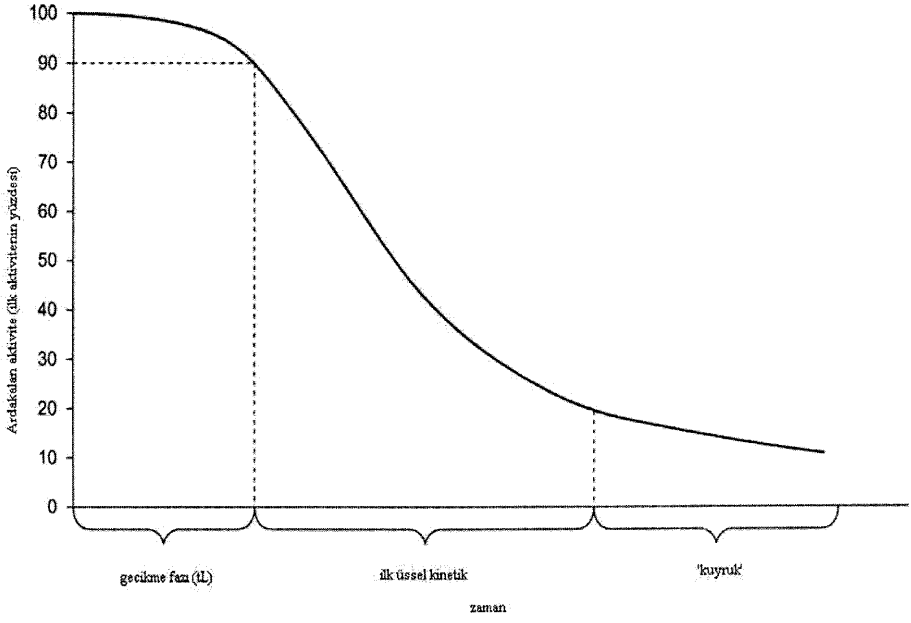
$14CO_2$ tayini

Dolaylı $14CO_2$ tayini

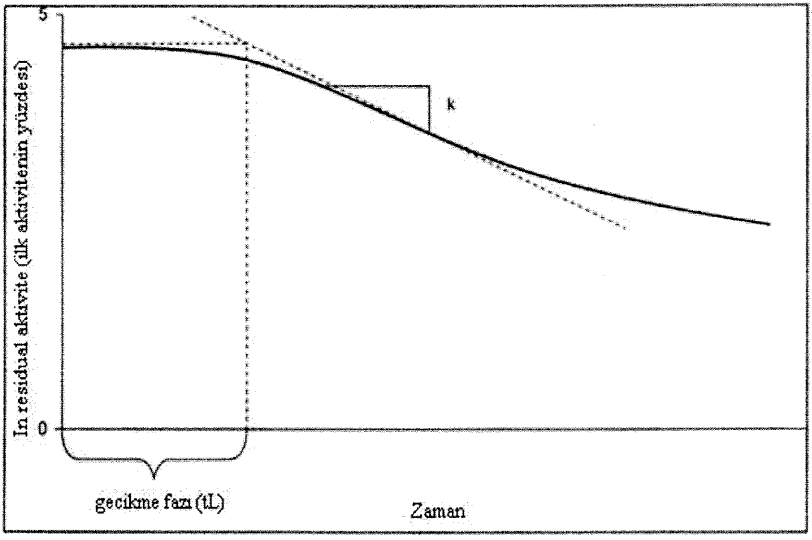
Eğer test maddesi uçucu değil ve uçucu dönüşüm ürünlerine dönüştürülemiyor ise rutin ölçümler için dolaylı yöntem, en az zaman alan ve en hassas ölçüm olur. Sadece süzülmemiş numuneler, örneğin 0,5 ml boyutta, küçük sintilasyon şişelerine aktarılır. Numuneler içindeki uygun aktivite ilk başlarda 5000 dpm-10 000 dpm'dir (80-170 Bq) ve minimum başlangıç aktivite yaklaşık 1 000 dpm'dir. 1-2 damla derişik H_3PO_4 ya da HCl ile 2-3 pH'a asitlendirmeden sonra CO_2 uzaklaştırılır. CO_2 uzaklaştırılması, 1/2-1 saatliğine hava ile kabarcıklanma ile uygulanabilir. Alternatif olarak küçük şişeler, 1-2 saatliğine güçlü bir şekilde çalkalanabilir (örneğin mikroplaka çalkalayıcı üzerinde) ya da gece boyunca daha nazik çalkalamaya bırakılır. CO_2 uzaklaştırılma yönteminin etkinliği kontrol edilmelidir (hava ile çalkalama sürecinin süresini uzatarak). Sıvı numunelerin sayılması için uygun olan sintilasyon sıvısı eklenmeli, numune girdap karıştırıcısında (whirling mixer) homojenize edilmeli ve test kör numunelerinde (FB) bulunan arka plan aktivitesi çıkarılarak sıvı sintilasyonuyla radyoaktivite tayin edilmelidir. Test suyu çok renkli olmadıkça ya da yüksek parçacık derişimi içermedikçe numuneler tek tip bir sönümü gösterecektir ve dış standart kullanarak sönüm doğrulamalarını uygulamak için yeterli olacaktır. Test suyu yüksek oranda renkli ise dahili standart eklenmesi yoluyla sönüm doğrulaması gerekli olabilir. Parçacık derişimi yüksek ise, homojen çözelti ya da jel elde etmek mümkün olamayabilir veya numuneler arasında sönüm çeşitliliği büyük olabilir. Bu durumda yukarıdaki test bulamaçları için açıklanan hesaplama yöntemi kullanılabilir. Test askıda sediman testi olarak uygulandığında, $14CO_2$ ölçümü, test suyu/süspansiyonunun 10 ml homojen numunesini alarak ve uygun hızda (örn. 40 000 m/s2, 15 dk için) santrifüjleme suretiyle fazları ayırarak dolaylı olarak uygulanır. O zaman sıvı faz yukarıda açıklandığı gibi işleme tabi tutulmalıdır. Parçacık fazdaki (POA) 14C aktivitenin tayini, küçük hacimdeki damıtık su içine tortuyu yeniden askıya alarak, küçük sintilasyon şişelerine aktararak ve bir jel oluşturmak için (bu amaca yönelik özel sintilasyon sıvıları mevcuttur) sintilasyon sıvısı eklenerek yapılmalıdır. Partiküllerin doğasına dayanarak (örneğin organik maddelerin içerikleri) bir doku çözücü ile gece boyunca numune parçalamak ve sonra sintilasyon sıvısının eklenmesinden önce girdap karıştırıcısında homojenize etmek uygun olabilir. Alternatif olarak POA, numune oksitleyici kullanarak yeterli oksijen ile yakma ile tayin edilebilir. Sayımda, iç standartlar her zaman olmalıdır ve her bir bağımsız numunede iç standart eklemesi yapılarak sönüm doğrulama yapmak gerekli olabilir.

Doğrudan $14CO_2$ tayini

Eğer mevcut $14CO_2$ doğrudan ölçülecekse, test başlangıcında daha fazla şişe temin edilmeli, kullanılan şişeler pH 2-3'e asitlendirilmeli ve her ölçüm noktasında test şişelerinden ürün alınarak iç (test başlangıcında her test şişesine yerleştirilmiş) ya da dış absorplayıcı içine $14CO_2$ taşınması sağlanmalıdır. Absorplama ortamı olarak ya alkali (örneğin 1 N NaOH çözelti) ya da bir NaOH topağı, etanolamin ya da etanolamin-bazlı ve ticari olarak elde edilebilir absorplayıcılar kullanılabilir. Doğrudan $14CO_2$ ölçümü için şişeler, örneğin bütil kauçuk septa ile kapatılmalıdır.



Şekil 1a- Aritmetik veri çizim grafiği örneği (zamana karşı artık aktivitesi)



Şekil 1b- Yarı logaritmik veri çizim grafiği örneği (artık aktivitenin zamana karşı ln'i)

C.26. LEMNA SP. BÜYÜME İNHİBİSYONU TESTİ

1. YÖNTEM

Bu yöntem, OECD TG 221 (2006) (1) ile eşdeğerdir. Lemna testinin, fazlasıyla renklendirilmiş algal teste alternatif olarak uygun olduğu AB yetkilileri tarafından kabul edilmiştir (2), (3).

1.1. Giriş

Bu Test Yöntemi, maddelerin Lemna grubu (su mercimeği) taze su sucul bitkilerine toksisitesini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Mevcut kılavuzlara (4), (5), (6), (7), (8), (9) dayanır, fakat son gelişmeleri yansıtan yöntemlerin modifikasyonunu ve bir takım anahtar sorunların konsültasyonunu da içerir. Önerilen yöntem, uluslararası dolanım testi ile geçerli kılınmıştır (10).

Bu Test Yöntemi, toksisite testini, Lemna gibba ve Lemna minor kullanarak açıklar, her ikisi de kapsamlı olarak çalışılmıştır ve yukarıda atıf yapılan standartların konusudur. Çok sayıda fenotipin mevcudiyetinden dolayı karmaşık olan Lemna spp taksonomisi zordur. Lemna ile; toksik maddelere yanıt vermede genetik çeşitlilik meydana gelebilmesine rağmen; bu Test Yöntemi ile, kullanılacak belirli bir klon önerebilmek için, bu kaynak çeşitliliğinde yeterli veri yoktur. Test yönteminin saf olarak yürütülmediği dikkate alınmalıdır, fakat diğer organizmalar ile kirlenmesini minimum tutmak için test prosedürü esnasında gerekli önlemler alınır.

Test çözeltisinin yenilenmesi ile (yarı statik ve sürekli akış) ve yenilenmesi olmadan (statik) test yapılması üzerine detaylar açıklanmaktadır. Testin amaçlarına ve düzenleyici gereksinimlere bağlı olarak yarı statik uygulama ve sürekli akış yöntemlerini dikkate almak tavsiye edilir, örneğin, uçuculuk, foto bozunma, tetikleme ya da biyolojik bozunmanın sonucu olarak çözeltiden çabuk bir şekilde kaybolan maddeler için. Daha fazla yardımcı bilgi (11)'de verilmektedir.

1.2. Tanımlar

Aşağıdaki tanımlar ve kısaltmalar, bu Test Yönteminin amaçları için kullanılır:

Biyokütle: popülasyonda bulunan canlı maddenin kuru ağırlığıdır. Bu testte yaprak hesaplamaları veya yaprak alanları için genellikle biyokütle yerine geçen vekiller(surrogate) ölçülür ve buna bağlı olarak 'biyokütle' teriminin kullanımı, aynı derecede ölçen bu vekillere karşılık gelir.

Kloroz: yaprak dokusunun sararmasıdır.

Klon: eşeysiz üreme ile tek fertten meydana gelen organizma ya da hücredir. Bu sebeple aynı klondan olan fertler genetik olarak birbirinin aynısıdır.

Koloni: birbirine tutturulmuş (genellikle 2 ila 4) ana ve kız yaprakların (mother and daughter fronds) kümelenmesi anlamına gelir. Bazen bitkiye de refere eder.

EC_x: belirlenmiş maruz kalma süresi içinde (eğer tam ya da normal test sürecinden sapma olursa açık bir şekilde belirtilmek üzere) Lemna büyümesindeki %x (örneğin %50) azalmayla sonuçlanan test ortamında çözünmüş test maddesinin derişimidir. Büyüme hızından ya da veriminden elde edilen EC değerini açık bir biçimde ifade etmek amacıyla büyüme hızı için 'E_rC' sembolü ve verim için 'E_yC' sembolü kullanılır, kullanılan ölçüm değişkeni tarafından takip edilir, örneğin, E_rC (yaprak sayısı).

Sürekli akış: sürekli olarak yeri değiştirilen test çözeltilerinin olduğu test.

Yaprak : su mercimeği bitkisinin ayrı/tek 'yaprağımsı' yapısıdır. Bu en küçük birimidir, örneğin ayrı, üreme yeterliliği olan.

Gibosite: kambur veya şişik görünüm sergileyen yaprak anlamına gelir.

Büyüme: ölçüm değişkenindeki artıştır, örneğin, test süresi boyunca yaprak sayısı, kuru ağırlık, yaş ağırlık ya da yaprak alanı.

Büyüme hızı (ortalama spesifik büyüme hızı): maruz kalma süresi boyunca biyokütledeki logaritmik artıştır.

Etki gözlemlenen en düşük konsantrasyonu (LOEC): Verilen maruz kalma sürecinde kontrol ile karşılaştırıldığında büyüme üzerine etkiyi istatiksel olarak önemli ölçüde azaltma etkisi ($p < 0,05$) gözlemlenen maddede test edilmiş en düşük konsantrasyondur. Bununla birlikte LOEC üzerindeki bütün konsantrasyonlar; LOEC'de gözlemlenmiş olana eşit ya da bundan daha büyük zararlı etkiye sahip olmalıdır. Bu iki koşula kanaat getirilemediğinde, LOEC'in (ve dolayısıyla NOEC) nasıl seçildiğini göstermek için tam bir açıklama verilmelidir.

Ölçüm değişkenleri: bir ya da daha fazla farklı tepki değişkeni kullanarak testin sonlanma noktasını ifade etmek için ölçülen her hangi bir değişken türü. Bu yöntemde yaprak sayısı, yaprak alanı, taze ağırlık ve kuru ağırlık ölçüm değişkenidir.

Monokültür: bir bitki türü olan kültürdür.

Nekroz: ölü (örneğin beyaz ya da su ile ıslanmış) yaprak dokusu.

Herhangi bir etkinin gözlemlenmediği konsantrasyon (NOEC): LOEC'in hemen altındaki test konsantrasyonudur.

Fenotip: çevresi ile genlerinin etkileşimi ile tayin edilen gözlemlenebilir organizma özellikleridir.

Tepki değişkenleri: farklı hesaplama yöntemleri ile biyokütleyi açıklayan herhangi ölçülmüş değişkenden türetilmiş toksisite tahmini için değişkenlerdir. Bu yöntem için büyüme hızları ve verim; yaprak sayısı, yaprak alanı, taze ağırlık ya da kuru ağırlık gibi ölçüm değişkenlerinden türetilen tepki değişkenleridir.

Yarı statik (yenileme) test: test esnasında belirli zaman aralıklarında periyodik olarak yeri değiştirilen test çözeltisinin olduğu test.

Statik test: test esnasında test çözeltisinin yenilenmesi olmayan test yöntemidir.

Test sonlanma noktası: testin amacı olarak kontrol ile ilgili test kimyasalıyla değişecek olan genel faktörü açıklar. Bu yöntemde test sonlanma noktası, bir ya da daha fazla ölçüm değişkenine dayanan farklı tepki değişkenleriyle ifade edilebilecek büyüme inhibisyonudur.

Test ortamı: test maddesine maruz bırakıldığında üzerinde test bitkilerinin büyüdüğü, tümüyle sentetik büyüme ortamıdır. Test maddesi, normal olarak test ortamında çözünecektir.

Verim: maruz kalma sürecinin sonundaki biyokütle eksi maruz kalma süreci başlangıcındaki ölçüm değişkenini ifade eden ölçüm değişkeninin değeridir.

1.3. Testin İlkesi

Lemna grubunun üssel olarak büyüyen bitki kültürlerinin, yedi günlük periyot boyunca farklı test maddesinin farklı derişimlerinde monokültürler olarak büyümesine izin verilir. Testin amacı, seçilen ölçüm değişkenlerinin değerlendirmesine bağlı olarak bu periyot boyunca bitkisel büyüme üzerine madde ile ilgili etkilerini nicel olarak değerlendirmektir. Yaprak sayısı, primer ölçüm değişkenidir. En az bir diğer ölçüm değişkeni (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık) de ölçülür, çünkü bazı maddeler diğer ölçüm değişkenlerini yaprak sayılarından daha fazla etkileyebilir. Madde ile ilgili etkileri nicel olarak değerlendirmek için test çözeltilerindeki büyüme, kontrolleri ile karşılaştırılır ve belirlenmiş %x büyüme inhibisyonunu (örneğin %50) gerçekleştiren derişim belirlenir ve EC_x (örneğin, EC50) olarak ifade edilir.
Test sonlanma noktası, maruz kalma sürecinde ölçüm değişkeninde (ortalama spesifik büyüme hızı) logaritmik artış olarak ifade edilen büyüme inhibisyonudur. Test çözeltisi serilerinde kaydedilen ortalama spesifik büyüme hızlarından, belirlenmiş %x büyüme hızı inhibisyonunu (örneğin %50) gerçekleştiren derişim tayin edilir ve E_rC_x (örneğin. E_rC_{50}) olarak ifade edilir.

Bu Test Yöntemi içinde kullanılan ilave bir tepki değişkeni de, bazı ülkelerde spesifik düzenleyici gereksinimlerin tamamlanması için gerekli olabilecek olan verimdir. Verim; maruz kalma sürecinin bitimindeki ölçüm değişkeni eksi maruz kalma süreci başlangıcındaki ölçüm değişkeni olarak ifade edilir. Test çözeltisi serilerinde kaydedilen verimden, belirlenmiş %x verim inhibisyonunu (örneğin %50) gerçekleştiren derişim hesaplanır ve E_yC_x (örneğin. E_yC_{50}) olarak ifade edilir.

Ayrıca, gözlemlenmiş en düşük etki konsantrasyonu (LOEC) ve gözlemlenmemiş etki konsantrasyonu (NOEC) istatistiksel olarak da tayin edilebilir.

1.4. Test Maddesi Hakkında Bilgi

Test ortamındaki maddenin nicel olarak değerlendirilmesi için yeterli hassasiyeti olan bir analitik yöntem mevcut olmalıdır.

Test koşullarını oluşturmak için kullanışlı olabilecek olan test maddesi hakkındaki bilgi, yapısal formül, saflık, suda çözünürlük, su içindeki kararlılık ve ışık, pKa, Kow, buhar basıncı ve biyobozunabilirlik hakkındaki bilgileri kapsar. Test periyodu esnasında önemli derecede test maddesi kaybı olması muhtemel ise bunu belirleyecek olan Henry kanunu sabitini hesaplamak amacıyla, sudaki çözünürlük ve buhar basıncı kullanılabilir. Bu, benzer kayıpları

kontrol etmek için atılması gereken adımların belirlenmesinde faydalı olacaktır. Test maddesinin çözünürlüğü ve kararlılığı hakkındaki bilgilerin kesin olmadığı durumda, bunların test koşulları altında değerlendirilmesi tavsiye edilir, örneğin; test içerisinde kullanılacak olan büyüme ortamı, sıcaklık, ışıklandırma rejimi.
Özellikle test ortamındaki pH kontrolü önemli olduğunda, örneğin metalleri ya da hidrolitik olarak kararlı olmayan test maddeleri test ederken, büyüme ortamına tampon ilavesi tavsiye edilir (bakınız bölüm 1.7.4, ilk paragraf). Buna ek olarak, testi zor hale getiren fizikokimyasal özellikleri olan maddeler için kılavuz da sağlanmaktadır (11).

1.5. Referans Madde

Uluslararası halka testinde (10) kullanılan 3,5-diklorofenol gibi referans madde(ler), test prosedürünü kontrol etme aracı olarak test edilebilir. En az yılda iki kez ya da testin daha düşük frekansta yapıldığı durumda, test maddesinin toksisite tayinine paralel olarak referans madde ile test etmek tavsiye edilir.

1.6. Testin Geçerliliği

Testin geçerli olabilmesi için kontrol içindeki yaprak sayısının iki katına çıkması için geçen süre, yaklaşık olarak yedi gün içinde yedi-kat artış ve 0,275 d-1 ortalama spesifik büyüme hızına tekabül eden 2,5 günden (60 saat) daha az olmalıdır. Bu Test Yöntemi içinde tanımlanan ortam ve test koşulları kullanıldığında, bu değerlendirme ölçütü statik test rejimi kullanımıyla elde edilebilir (8). Bu değerlendirme ölçütünün yarı-statik ve sürekli akış test koşulları altında da gerçekleştirilebilir olması beklenmektedir. İki katına çıkma süresinin hesaplaması bölüm 2.1'de gösterilmektedir.

1.7. Yöntemin Açıklaması

1.7.1. Düzenek

Test ortamı ile temas halinde olan bütün ekipmanlar camdan ya da diğer kimyasal olarak inert maddelerden olmalıdır. Kültürleme ve test amaçları için kullanılan cam malzemeler, test ortamının içine nüfuz edebilecek kimyasal artıklardan temizlenmeli ve steril hale getirilmelidir. Test kapları, test bitiminde birbiri üstüne binme olmaksızın büyüme için kontrol kaplarında farklı kolonilerin yaprakları için yeterince geniş olmalıdır. Eğer kökler test kaplarının dibine değer ise önemli değildir ancak her test kabı içindeki minimum 20 mm derinlik ve minimum 100 ml hacim tavsiye edilir. Bu gereksinimler karşılandığı takdirde test kaplarının seçimi kritik bir öneme sahip değildir. Uygun ölçülerdeki cam beherler, kristalleştirme kapları ya da cam petri kaplarının uygun olduğu kanıtlanmıştır. Test kapları gerekli hava değişimine izin verirken, buharlaşmayı en aza indirmek ve kaza ile olabilecek kirlenmeyi minimize etmek amacıyla kapatılmalıdır. Uygun test kapları ve özellikle kapaklar ışığın spektral özelliklerinin değişimini ya da gölgelenmesini önlemelidir.
Kültürler ve test kapları bir arada tutulmamalıdır. Bu en iyi şekilde ayrı çevresel büyüme odacıkları, inkübatörler ya da odalar kullanarak başarılabilir. Işıklandırma ve sıcaklık, sabit bir seviyede olmalıdır ve kontrol edilebilmelidir (bakınız bölüm 1.7.8).

1.7.2. Test organizması

Bu test için kullanılan organizma ya Lemna gibba ya da Lemna minor'dür. Toksisite testi için kullanılan su mercimeği türlerinin kısa açıklamaları Ek-I'de verilmektedir. Bitki materyali, bir

kültür birikintisinden, diğer laboratuvardan ya da sahadan elde edilebilir. Bitkiler, eğer sahadan toplanmış ise, kullanımdan önce en az sekiz hafta test için kullanılanlarla aynı ortamda, kültür içinde muhafaza edilmelidir. Başlangıç kültürlerini toplama için kullanılan saha alanları, kesin kirlilik kaynaklarından arındırılmış olmalıdır. Eğer bir diğer laboratuvardan ya da kültür birikintisinden sağlanmış ise benzer şekilde en az üç hafta muhafaza edilmelidir. Test için kullanılan bitki malzemesi ve türü ve klonlarının (eğer biliniyor ise) kaynağı her zaman rapor edilmelidir.

Alg ve protozoalar gibi diğer organizmalarla gözle görülür bir şekilde kirlilikten arınmış olan monokültürler kullanılmalıdır. Sağlıklı L.gibba kolonileri yedi yaprağa kadar içerebilir iken sağlıklı L.minor bitkiler iki ve beş arasında yaprak içeren kolonilerden oluşur.

Test için kullanılan bitkilerin kalitesi ve homojenliğinin, test sonuçları üzerine önemli bir etkisi olacaktır ve bu sebep dikkatli seçilmelidir. Genç ve görünebilir lezyonlar ve lekeler olmadan hızla büyüyen bitkiler kullanılmalıdır. İyi kalitedeki kültürler, en az iki yaprak içeren kolonilerin yüksek etkisi ile belirlenirler. Büyük miktardaki tek yapraklar ortam stresinin belirleyicisidir, örneğin besin sınırlaması ve kültürler gibi bitki malzemeleri test için kullanılmamalıdır.

1.7.3. Yetiştirme

Kültür muhafazasının frekansını azaltmak için (örneğin bir periyot için Lemna testi planlanmadığında) kültürler, azaltılmış ışıklandırma ve sıcaklık (4-10 oC) altında tutulabilir. Kültürlemeye ait detaylar Ek-II'de verilmektedir. Alg ve diğer organizmalar ile gözle görülür kirlenme işaretleri, temiz ortama aktarımı takip eden Lemna yapraklarının alt örneklerinin yüzey sterilizasyonunu gerektirecektir (bkz. Ek-II). Bunun sonucu olarak kalan kirlenmiş kültür atılmalıdır.

En az testten yedi gün önce etkili koloniler, aseptik olarak taze steril ortam içerisine transfer edilir ve test koşulları altında 7-10 günlüğüne kültürlenir.

1.7.4. Test ortamı

Aşağıda açıklandığı üzere Lemna minör ve Lemna gibba için farklı ortamlar tavsiye edilir. Test maddesi ile tepkiye girebileceği ve toksisite ifadesini etkileyebileceği konusunda şüphe duyulduğunda; test ortamına pH tamponunun (L.minor ortam içinde MOPS (4-morfolin propan sülfonik asit, CAS No: 1132-61-2; EINECS No: 214-478-5) ve L.gibba ortam içinde NaHCO3) dahil edilmesine dikkat edilmelidir. Steinberg Ortamı (12) da, geçerlilik kriteri sağlandığı takdirde kabul edilebilirdir.

L.minor ile test yapma ve kültürleme için Lemna büyüme ortamı İsveç Standardı (SIS) modifikasyonu tavsiye edilir. Ortam içeriği, Ek-III içinde verilmektedir.

Ek-III içinde açıklanan 20X – AAP büyüme ortamı, L.gibba ile test yapma ve kültürleme için tavsiye edilir.

Steinberg ortamı Ek-III içinde açıklandığı gibi L.minor için uygundur aynı zamanda geçerlilik kriteri sağlandığı sürece L.gibba için de kullanılabilir.

1.7.5. Test çözeltileri

Test çözeltileri, genellikle stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanır. Test maddelerinin stok çözeltileri, genellikle maddenin büyüme ortamında çözülmesi ile hazırlanır.

Test maddesinin en yüksek test edilmiş derişimi, normal şartlarda test koşulları altında maddenin sudaki çözünürlüğünü geçmemelidir. Bununla birlikte Lemna spp.ın yüzeyde gezindiği ve su-hava ara yüzeyinde birikmiş maddelere maruz kalabileceği dikkate alınmalıdır (örneğin yetersiz derecede suda çözünen ya da hidrofobik maddeler ya da yüzey aktif maddeler). Bu gibi durumlarda maruz kalma çözeltiden değil materyalden kaynaklanacaktır ve test maddesinin özelliğine bağlı olarak test derişimleri sudaki çözünürlüğü geçebilir. Sudaki çözünürlüğü düşük olan test maddeleri için; test ortamına test maddesinin doğru miktarının eklenmesini kolaylaştırmak ve dağılımına ve çözünmesine yardım etmek amacıyla organik solvent ya da dağıtıcı kullanarak konsantre edilmiş stok çözeltisi ya da madde dispersiyonu hazırlamak gerekebilir. Mümkün olduğunca bu gibi maddelerin kullanımından kaçınılmalıdır.

Yardımcı çözücü ya da dağıtıcı kullanımından kaynaklanan hiçbir fitotoksisite olmamalıdır. Örneğin 100 µl·l–1'e kadar derişimlerde fitoktoksisiteye sebebiyet vermeyen yaygın kullanımlı çözücüler, aseton ve dimetilformamit içerir. Eğer bir çözücü ya da dağıtıcı kullanılır ise son derişim rapor edilmeli, minimuma ($\leq$ 100 µl·l–1) sabitlenmeli ve bütün muamele ve kontroller, aynı çözücü ya da dağıtıcı derişimini içermelidir. Dağıtıcı kullanımı hakkında daha fazla bilgi (11)'de yer almaktadır.

1.7.6. Test ve kontrol grupları

Test maddesinin, Lemna'ya toksisitesi hakkındaki ön bilgiler, örneğin aralık bulma testi, uygun test konsantrasyonlarının seçiminde yardımcı olacaktır. Açıklayıcı toksisite testinde, normal durumda geometrik serilerde hazırlanmış en az beş test konsantrasyonu olmalıdır. Tercihen test konsantrasyonları arasındaki ayrım faktörü 3,2'yi geçmemelidir, fakat konsantrasyon-tepki eğrisinin düz olduğu yerde daha büyük bir değer kullanılabilir. Eğer beşten daha az konsantrasyon kullanılır ise gerekçelendirme yapılmalıdır. Her test konsantrasyonunda en az üç tekrarlama kullanılmalıdır.

Test konsantrasyonları aralığının belirlenmesinde (aralık bulma ve/veya açıklayıcı toksisite testi için) aşağıdakiler dikkate alınmalıdır:

— EC_x tayini için, uygun güven seviyesini sağlamak amacıyla test konsantrasyonları, EC_x değerini desteklemelidir. Örneğin, eğer EC50 tahmini yapılır ise en yüksek test konsantrasyonu, EC50'den daha büyük olmalıdır. Eğer EC50 değeri, test konsantrasyonları aralığının dışında olur ise ortak güven aralıkları büyük olacaktır ve modelin istatiksel uyumunun düzgün bir değerlendirmesi mümkün olmayabilir.

— Eğer amaç LOEC/NOEC tahmini ise, en düşük test konsantrasyonu, büyümenin kontroldekinden önemli derecede daha az olmamasını sağlayacak yeterlilikte düşük olmalıdır. Buna ek olarak en yüksek test konsantrasyonu, büyümenin kontroldekinden önemli derecede daha düşük olmasını sağlayacak yeterlilikte yüksek olmalıdır. Eğer durum böyle değil ise, farklı konsantrasyon aralığı kullanarak test tekrar edilmek zorunda kalacaktır (en yüksek konsantrasyon, sınır çözünürlükte ya da konsantrasyon sınırı gerektiren maksimumda değil ise, örn. 100 mg·l–1).

Her test, test maddesi olmadan test kapları gibi aynı besin ortamından, yaprak ve koloni sayısından, çevresel koşullardan ve prosedürlerden oluşan kontrolleri içermelidir. Eğer yardımcı çözücü ya da dağıtıcı kullanılır ise içinde test maddesi olan kaplar içindeki ile aynı konsantrasyonda bulunan çözücü/dağıtıcı ile ilave bir kontrol muamelesi içermelidir. Tekrarlama kontrol kaplarının sayısı (ve çözücü kapları, eğer uygulanabilir ise), her test konsantrasyonu için kullanılan kap sayısının en az iki katına eşit olmalıdır.

Eğer NOEC tayini gerekli değil ise test tasarımı, konsantrasyon sayısını arttırmak ve her konsantrasyon için tekrar sayısını azaltmak için değiştirilebilir. Ancak kontrol tekrarlarının sayısı en az üç olmalıdır.

1.7.7. Maruz Kalma

2 ila 4 görünür yapraktan meydana gelen koloniler, aşılama kültüründen aktarılır ve aseptik koşullar altında rastgele bir şekilde test kaplarına verilir. Her test kabı, toplamda 9 ila 12 yaprak içermelidir. Yaprak ve kolonilerin sayısı, her test kabında aynı olmalıdır. Bu yöntem ve dolanım testi verileri ile kazanılan deneyim; her muamele için üç tekrar (her tekrar başlangıçta 9 ila 12 yaprak içerir) kullanılmasının, muameleler arasındaki büyüme hızı (verimle hesaplanmış %10 ila %15) ile hesaplanmış yaklaşık %4 ila %7 inhibisyonun büyümedeki farklılıklarını tespit etmek için yeterli olduğunu göstermiştir (10).
İnkübatör içindeki test kaplarının yerleşimi için rastgele bir tasarım, ışık şiddetindeki ve sıcaklıktaki uzaysal farklılıkların etkisini en aza indirmek amacıyla gerekmektedir. Bloke edilmiş bir tasarım ya da gözlemler yapıldığında kapların rastgele yerdeğiştirilmesi (ya da daha sık yer değiştirilmesi) de gereklidir.
Eğer ön stabilite testi, test maddesi konsantrasyonunun test süresi boyunca (7 gün) muhafaza edilemeyeceğini gösterir ise (örneğin ölçülmüş derişim ölçülmüş başlangıç derişiminin %80'i altına düşer), yarı statik bir test rejimi tavsiye edilir. Bu durumda koloniler, test esnasında (örneğin 3. ve 5. günlerde) en az iki uygun zamanda taze olarak hazırlanmış test ve kontrol çözeltilerine maruz bırakılmalıdır. Taze ortama maruz kalma sıklığı test maddesinin kararlılığına bağlı olacaktır; yüksek derecede kararlı olmayan ya da uçucu maddelerin sabite yakın derişimlerini muhafaza etmek amacıyla daha yüksek bir frekans gerekli olabilir. Bazı durumlarda bir sürekli-akış prosedürüne ihtiyaç duyulabilir (11), (13).

Yaprak uygulaması (sprey) yoluyla maruz kalma senaryosu, bu Test Yöntemi içinde kapsanmamaktadır, bunun yerine bakınız (14).

1.7.8. İnkübasyon koşulları

Lemna yaprakları gibi (6 500 – 10 000 lüks'e eşit) ışık kaynağından aynı mesafedeki noktalarda fotosentetik olarak aktif radyasyon (400 – 700 mm) içinde ölçüldüğünde 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ aralığından seçilmiş bir ışık şiddetini sağlamak amacıyla sürekli ısıtma ya da serin beyaz floresan ışıklandırma kullanılmalıdır. Test alanı üzerinden seçilmiş ışık kuvvetindeki herhangi bir farklılık ± %15'i geçmemelidir. Işık tespiti ve ölçümü yöntemi, özellikle algılayıcı tipi, ölçülen değeri etkileyecektir. Küresel algılayıcılar (ölçüm düzleminin altındaki ve üzerindeki bütün açılardan ışığa tepki gösteren) ve 'kosinüs' algılayıcılar (ölçüm düzleminin üzerindeki bütün açılardan ışığa tepki gösteren) tek yönlü algılayıcılara nazaran tercih edilir ve bunlar, bu bölümde açıklanan tipin çoklu nokta ışık kaynağı için daha yüksek okuma değeri verecektir.

Test kaplarındaki sıcaklık 24 ± 2 °C olmalıdır. Kontrol ortamının pH'ı, test esnasında 1,5 birimden daha fazla artmamalıdır. Bununla birlikte geçerlilik kriterinin sağlandığı gösterildiği takdirde, 1,5 birimden daha fazla sapma, testi geçersiz kılmayacaktır. Kararlı olmayan maddeler ya da metallerin test edilmesi gibi özel durumlarda pH kayması için ilave önleme ihtiyaç duyulur. Daha fazla bilgi için (11)'e bakınız.

1.7.9. Süreç

Bitkiler, test kaplarına aktarıldıktan 7 gün sonra test sonlandırılır.

1.7.10. Ölçümler ve analitik tayinler

Testin başlangıcında, hesaplanmış açıkça görünen yaprakların çıktığına emin olunmasına dikkat edilerek test kaplarındaki yaprak sayısı hesaplanır ve kaydedilir. Normal ya da abnormal görünen yaprak sayıları, testin başlangıcında, maruz kalma süresince her 3 günde bir (örneğin 7 günlük periyot esnasında en az iki uygun zamanda) ve test bitiminde tayin edilmelidir. Örneğin; yaprak boyutu, görünümü, nekrosis belirtisi, kloroz ya da gibosite, koloninin dağılması ya da kaldırma kuvvetindeki kayıp gibi bitki gelişimindeki ve kök uzunluğu ve görünümündeki değişiklikler dikkate alınmalıdır. Test ortamının önemli özellikleri (örneğin çözünmeyen madde olması, test kabında alg büyümesi) de dikkate alınmalıdır.
Test esnasında yaprak sayısının tayinine ek olarak aşağıdaki ölçüm değişkenlerinin biri (ya da daha fazlası) üzerindeki test maddesinin etkileri de değerlendirilir:
(i) toplam yaprak alanı;
(ii) kuru ağırlık;
(iii) taze ağırlık.

Toplam yaprak alanının, her test ve kontrol kabı için test başlangıcında, test esnasında ve test bitiminde belirlenebilme avantajı vardır. Kuru ya da taze ağırlık tayini, test başlangıcında, testi başlatmak için kullanılan temsili aşılama kültür numunesinden ve testin bitiminde her test ve kontrol kabından bitki materyali ile yapılmalıdır. Eğer yaprak alanı ölçülmez ise taze ağırlığa göre kuru ağırlık tercih edilir.

Toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ve taze ağırlık aşağıdaki şekilde belirlenebilir:

(i) Toplam yaprak alanı: Bütün kolonilerin toplam yaprak alanının tayini görüntü analizleri ile yapılabilir. Test kaplarının ve bitkilerinin görüntüsü video kamera kullanılarak çekilebilir (örneğin kabı bir ışık kutusu üzerine yerleştirerek) ve son görüntü sayısallaştırılır. Bilinen alanın düz şekiller ile kalibrasyonu yapıldıktan sonra bir test kabındaki toplam yaprak alanının tayini yapılabilir. Test kabının kenarından kaynaklanan müdaheleyi hariç tutmak için önlem alınmalıdır. Bir alternatif fakat daha zor bir yaklaşım; test kaplarının ve bitkilerinin kopyasını almak, kolonilerin son görünümünü kesip almak ve yaprak alanı analizörü ya da grafik kağıdı kullanarak alanlarını belirlemektir. Diğer teknikler (örneğin koloni alanları ve birim alan görünümü arasındaki sayfa ağırlık oranı) de uygun olabilir.
(ii) Kuru ağırlık: Bütün koloniler her bir test kabından alınır ve damıtık ya da deiyonize su ile yıkanır. Su fazlasının uzaklaştırılması için kurutma kağıdında tutulur ve daha sonra sabit bir ağırlığa ulaşana kadar 60 oC'de kurutulur. Herhangi bir kök fragmenti içerilmelidir. Kuru ağırlık en az 0,1 mg doğrulukla ifade edilmelidir.
(iii) Taze ağırlık: Bütün koloniler, yuvarlak tabanında küçük (1 mm) delikler olan önceden tartılmış polistiren (ya da başka bir inert madde) tüplere aktarılır. Daha sonra tüpler, oda

sıcaklığında 10 dakika boyunca 3 000 rpm'de santrifüjlenir. Artık kuru olan kolonileri içeren tüpler yeniden tartılır ve taze ağırlık, boş tüpün ağırlığı çıkartılarak hesaplanır.

1.7.10.1. Ölçümlerin sıklığı ve analitik tayinler

Eğer statik bir test tasarımı kullanılır ise test başlangıcında ve test sonunda, her muamelenin pH'ı ölçülmelidir. Eğer yarı statik bir test tasarımı kullanılır ise pH, her yenilemeden önce her bir seri 'taze' test çözeltisinde ve ilgili 'harcanmış' çözeltide ölçülmelidir.

Işık şiddeti, büyüme odacığında, inkübatör ya da ışık kaynağından Lemna yaprakları kadar aynı uzaklıkta bulunan noktalardaki odalarda ölçülmelidir. Ölçümler, test esnasında en az bir kere yapılmalıdır. Büyüme odacığı, inkübatör ya da odadaki ile aynı koşullar altında tutulan vekil (surrogate) bir kap içindeki ortam sıcaklığı en az günlük olarak kaydedilmelidir

Test esnasında test maddesinin derişimleri uygun aralıklarda tayin edilir. Statik testlerde asgari gereksinim, testin başlangıç ve bitiminde derişimlerin tayinini yapmaktır.

Test maddesi derişiminin nominal derişimin ± %20'si içinde kalmasının beklenmediği yarı statik testlerde, her yenilenmede taze olarak hazırlanmış bütün test çözeltilerini ve aynı çözeltileri analiz etmek gereklidir (bkz. bölüm 1.7.7, üçüncü paragraf). Ancak test maddesinin ölçülmüş başlangıç derişiminin, nominalin ± %20'si içinde olmadığı fakat başlangıç derişiminin tekrarlanabilir ve kararlı olduğunu gösterebilmek için yeterli kanıtın sağlanabildiği (örneğin başlangıç derişiminin %80-120 aralığı içinde) durumdaki testlerde kimyasal tayinler, sadece en yüksek ve en düşük test derişimlerinde yürütülebilir. Bütün durumlarda yenilenmeden önce test maddesi derişimlerinin tayininin, her test derişiminde sadece bir tekrarlama kabında yürütülmesi gerekir (ya da kapların içeriği tekrarlama ile bir araya getirilir).

Eğer sürekli-akış testi kullanılmakta ise, testin başlangıcında, ortasında ve bitimindeki analizleri içeren yarı statik testler için açıklanmış olan benzer numuneleme rejimi uygundur, fakat bu durumda 'harcanan' çözelti ölçümü uygun değildir. Bu tür bir testte seyreltici akış hızı ve test maddesi ya da test maddesi stok çözeltisi günlük olarak kontrol edilmelidir.

Eğer test edilmiş madde derişiminin, nominal ya da test süresince ölçülmüş başlangıç derişimin ± %20'si içinde tatmin edici derecede elde edildiğine dair kanıt var ise sonuçların analizi, nominal ya da ölçülmüş başlangıç değerlere dayanabilir. Eğer nominal ya da ölçülmüş başlangıç derişiminden sapma ± %20'den daha büyük ise sonuçların analizi, maruz kalma esnasındaki geometrik ortalama derişimine ya da test maddesinin derişim düşüşünü tanımlayan modellere dayanmalıdır (11).

1.7.11. Limit Testi

Bazı durumlarda, örneğin 100 mg·l–1'e kadar olan ya da test ortamında (daha düşük olan) çözünürlük limitine kadar olan derişimlerde test maddesinin toksik etkisinin olmadığını gösteren bir ön test olduğunda, bir kontrol grubu ya da bir muamele grubu (100 mg·l–1 ya da çözünürlük limitine eşit derişim) içindeki tepkilerin karşılaştırmasını içeren bir limit testi yapılabilir. Bunun maruz kalma derişiminin analizi ile desteklenmesi şiddetle tavsiye edilir. Daha önceden tanımlanan test koşulları ve limit testine uygulanan geçerlilik kriteri, muamele tekrar sayısının haricinde iki katına çıkarılmalıdır. Kontrol ve muamele grubundaki büyüme,

ortalamaları karşılaştırmak için bir istitistiksel test kullanılarak analiz edilebilir, örneğin Student's t-test.

2. VERİ VE RAPOR ETME

2.1. İki katına çıkarma süresi

Yaprak sayısının iki katına çıkma süresinin (Td) ve çalışma ile (bölüm 1.6) bu geçerlilik kriterine katılımın tayinini yapmak için kontrol kaplarından elde edilen veri ile aşağıdaki formül kullanılır:

$Td = \ln 2/\mu$

burada μ, bölüm 2.2.1, birinci ve ikinci paragrafta açıklanan belirlenmiş ortalama spesifik büyüme hızıdır.

2.2. Tepki değişkenleri

Testin amacı, Lemna'nın bitkisel büyümesi üzerindeki test maddesi etkilerinin tayinini yapmaktır. Bu Test Yöntemi iki tepki değişkenini tanımlar, çünkü üye ülkelerin farklı tercih ve düzenleyici gereksinimleri vardır. Bütün üye ülkelerde test sonuçlarının kabul edilebilir olabilmesi için, aşağıda tanımlanan her iki tepki değişkeni (a) ve (b) kullanılarak etkiler değerlendirilmelidir.

(a) Ortalama spesifik büyüme hızı: bu tepki değişkeni, yaprak sayılarının logaritmasındaki değişikliklere dayanarak ve buna ek olarak kontrollerdeki ve her muamele grubundaki zaman aşımı (günlük açıklanan) diğer ölçüm parametrelerinin logaritmalarındaki (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık) değişikliklere dayanarak hesaplanır. Bu bazen bağıl büyüme hızına karşılık gelir (15).

(b) Verim: bu tepki değişkeni, yaprak sayısındaki değişikliklere dayanarak ve buna ek olarak test bitimine kadar kontrollerdeki ve her muamele grubundaki diğer ölçüm parametrelerindeki (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık) değişikliklere dayanarak hesaplanır.

Bu iki tepki değişkeni kullanılarak hesaplanan toksisite değerlerinin, karşılaştırılabilir olmadığı dikkate alınmalıdır ve bu farklılık testin sonuçları kullanılırken göz önünde bulundurulmalıdır. Söz konusu yaklaşımların matematiksel temellerine göre; eğer bu Test Yönteminin test koşullarına sadık kalınır (adhered to) ise ortalama spesifik büyüme hızına (ErCx) dayanan ECx değerleri genellikle, verime (EyCx) dayanan sonuçlardan daha yüksek olacaktır. Bu, iki tepki değişkeni arasındaki hassasiyet farklılığı olarak yorumlanmamalıdır, sadece değerler matematiksel olarak farklıdır. Ortalama spesifik büyüme hızı kavramı, sınırlanmamış kültürlerde su mercimeğinin genel üssel büyüme biçimine dayanır, burada kontrolün spesifik büyüme hızı mutlak seviyesine, konsantrasyon-tepki eğrisinin eğimine ya da test süresine bağlı olmadan, toksisite büyüme hızı üzerindeki etkilere dayalı olarak tahmin edilir. Aksine, verim tepki değişkenine bağlı olan sonuçlar bütün bu diğer değişkenlere bağlıdır. EyCx, her testte kullanılan su mercimeği türlerinin spesifik büyüme hızına ve türler ve hatta farklı klonlar arasında çeşitlenebilen maksimum spesifik büyüme hızına bağlıdır. Bu tepki değişkeni, su mercimeği türleri ya da farklı klonlar arasındaki, toksik maddeye hassasiyeti karşılaştırmak için kullanılmamalıdır. Toksisite tahmini için ortalama spesifik büyüme hızının kullanımı bilimsel olarak tercih edilirken, bazı ülkelerde mevcut düzenleyici gereksinimleri yerine getirmek amacıyla verime dayalı toksisite tahmini de bu Test Yöntemi içerisindedir.

Toksisite tahminleri, yaprak sayısına ve bir ilave ölçüm değişkenine (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık) dayanmalıdır, çünkü bazı maddeler, yaprak sayısından daha çok diğer ölçüm değişkenlerini etkileyebilir. Bu etki sadece yaprak sayısı hesaplanarak tespit edilemez.

Yaprak sayısı da, herhangi bir diğer kaydedilmiş ölçüm değişkeni gibi, örneğin toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık, her ölçüm durumu için test maddesi derişimleri ile birlikte tabloya dökülür. Sonraki veri analizi, örneğin LOEC, NOEC ya da ECx tahmini için, ayrı tekrarlar için değerlere dayanmalı ve her muamele grubu için ortalamalar hesaplanmamalıdır.

2.2.1. Ortalama spesifik büyüme hızı

Spesifik bir süre için ortalama spesifik büyüme hızı, büyüme değişkenlerindeki– yaprak sayısı ve bir diğer ölçüm değişkeni (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık)- logaritmik artış olarak, her kontrol ve muamele tekrarı için aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

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

burada:

- μ_{i-j} i den j ye zaman aralığında ortalama spesifik büyüme hızı
- N_i i zamanında test ya da kontrol kabındaki ölçüm değişkeni
- N_j j zamanında test ya da kontrol kabındaki ölçüm değişkeni
- t i den j ye olan zaman aralığı

Her muamele grubu ve kontrol grubu için, varyans tahminleri ile birlikte büyüme hızı için bir ortalama değer hesaplanır.
Ortalama spesifik büyüme hızı, bütün test süresi (yukarıdaki formüldeki 'i' zamanı testin başlangıcı ve 'j' zamanı testin bitimidir) için hesaplanmalıdır. Her test derişimi ve kontrolü için, varyans tahminleri ile birlikte ortalama spesifik büyüme hızı için bir ortalama değer hesaplanır. Buna ek olarak, maruz kalma süresi boyunca meydana gelen test maddesi etkilerini değerlendirmek amacıyla bölüm–bölüm büyüme hızı değerlendirilmelidir (örneğin log dönüştürülmüş büyüme eğrilerini inceleyerek). Ayrı bölümlerdeki büyüme hızı ve ortalama büyüme hızı arasındaki önemli farklılıklar, sabit üssel büyümeden sapmayı gösterir ve dolayısıyla büyüme eğrilerinin derinlemesine tetkik edilmesi garanti altına alınır. Bu durumda korumalı bir yaklaşım, maksimum inhibisyonun zaman aralığı esnasında muamele edilmiş kültürlerini, aynı zaman aralığı esnasında kontroller için olanlar ile karşılaştırabilir.
Büyüme oranının (Ir) yüzde inhibisyonu, aşağıdaki formüle uygun olarak her test derişimi (muamele grubu) için hesaplanabilir:

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

burada:

- $\%\ I_r$: ortalama spesifik büyüme hızındaki yüzde inhibisyon
- μ_C: kontrol içinde μ için ortalama değer
- μ_T: muamele grubu içinde μ için ortalama değer

2.2.2. Verim

Verim üzerindeki etkilerin tayini, iki ölçüm değişkenine, yaprak sayısına ve test başlangıcında ve test bitiminde her bir test kabında bulunan bir diğer ölçüm değişkenine (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık) dayanarak yapılır. Kuru ya da taze ağırlık için başlangıç

biyokütlesinin tayini, test kaplarını aşılamak için kullanılan aynı seriden alınmış yapraklar numunelerine dayanarak yapılır (bkz. bölüm 1.7.3, ikinci paragraf).

Her test derişimi ve kontrolü için varyans tahminleri ile birlikte verim için ortalama bir değer hesaplanır. Verimdeki (% Iy) ortalama yüzde inhibisyon, aşağıda gösterildiği gibi her muamele grubu için hesaplanabilir:

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

— % I_y: verimdeki yüzde azalma
— b_C: kontrol grubu için son biyokütle eksi başlangıç biyokütlesi
— b_T: muamele grubu için son biyokütle eksi başlangıç biyokütlesi

2.2.3. Derişim – tepki eğrilerinin grafiğe aktarımı

Tepki değişkeninin ortalama yüzde inhibisyonu (bölüm 2.2.1, son paragrafında ya da bölüm 2.2.2 de gösterilen hesaplanmış I_r ya da I_y) ve test maddesinin log derişimi ile ilgili derişim–tepki eğrileri çizilmelidir.

2.2.4. EC_x tahmini

EC_x (e.g. EC50) tahminleri, hem ortalama spesifik büyüme hızına (E_rC_x) hem de verime bağlı olmalıdır, her biri sırasıyla yaprak sayısına ve bir ilave ölçüm değişkenine (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık) dayanmalıdır. Bunun sebebi yaprak sayısını ve bir ilave ölçüm değişkenini farklı olarak etkileyen test maddelerinin varlığıdır. Bu nedenle istenen toksisite parametreleri, hesaplanmış her inhibisyon seviyesi x için: E_rC_x (yaprak sayısı); E_rC_x (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık); E_yC_x (yaprak sayısı); ve E_yC_x (toplam yaprak alanı, kuru ağırlık ya da taze ağırlık), olmak üzere dört EC_x değerleridir.

2.3. İstatistiksel Prosedürler

Amaç, regresyon analizi ile nicel bir derişim–tepki ilişkisi elde etmektir. Tepki verisinin doğrusallaştırma dönüşümünü uyguladıktan sonra ağırlıklanmış doğrusal regresyonu kullanmak mümkündür – örneğin probit ya da logit ya da Weibull birimleri (16), fakat doğrusal olmayan regresyon prosedürleri, kaçınılmaz veri düzensizlikleri ve düzgün dağılımdan sapmaları daha iyi kontrol altında tutan teknikler olarak tercih edilir. Sıfır ya da toplam inhibisyon yaklaşımıyla, bu gibi düzensizlikler, analize müdahil olarak dönüşümle büyütülebilir (16). Probit, logit ya da Weibull dönüşümü kullanılan analiz standart yöntemlerinin, kuantal (örneğin ölüm ya da hayatta kalma) verisinin kullanımına yönelik olduğu ve büyüme hızı veya verim verisini düzenlemek için modifiye edilmesi gerektiği dikkate alınmalıdır. Sürekli veriden EC_x değerlerinin tayini için spesifik prosedürler, (17), (18), ve (19) da bulunabilir.

Analiz edilecek olan her tepki değişkeni için EC_x değerlerinin nokta tahminlerini hesaplamak amacıyla derişim – tepki ilişkisi kullanılır. Mümkün olduğunda her tahmin için %95 güven sınırı belirlenmelidir. Tepki verisinin regresyon modeline uyumundaki düzgünlük, ya grafiksel olarak ya da istatistiksel olarak değerlendirilmelidir. Regresyon analizi, muamele grubu olmayan ayrı tekrarlı tepkiler kullanılarak yürütülmelidir.

Eğer mevcut olan regresyon modelleri/yöntemleri, veri için uygun değil ise EC50 tahminleri ve güven sınırları, ön yükleme ile doğrusal içdeğerbiçim kullanılarak elde edilebilir (20).

LOEC ve dolayısıyla NOEC tahmini için varyans (ANOVA) tekniklerinin analizini kullanarak muamele ortalamalarını karşılaştırmak gereklidir. Her derişim için ortalama, uygun çoklu karşılaştırma ya da trend test yöntemi kullanarak karşılaştırılmalıdır. Dunnett ya da William testi kullanışlı olabilir (21), (22), (23), (24). Varyans tutmalarının homojenliğinin ANOVA varsayımı olup olmadığını değerlendirmek gereklidir. Bu değerlendirme, grafiksel olarak ya da formal bir test ile yürütülebilir (25). Levene ya da Barlett uygun testlerdir. Varyans homojenitesi varsayımını karşılamadaki hata bazen verinin logaritmik dönüşümü ile düzeltilebilir.

Eğer varyans heterojenitesi çok büyük ve dönüşüm ile düzeltilemiyor ise, Jonkheere inme trend testi gibi yöntemlerle analizler dikkate alınmalıdır. NOEC tayini hakkında ilave kılavuz, (19)'da bulunabilir.

Yeni bilimsel gelişmeler, NOEC kavramından vazgeçilmesini tavsiye etmekte ve EC_x nokta tahminlerine dayanan regresyon ile yer değiştirme yapılmasına yönlendirmektedir. Bu Lemna testi için x'e uygun bir değer belirlenmemiştir. Bununla birlikte %10 ila %20 aralığının uygun olacağı düşünülmektedir (seçilen tepki değişkenine bağlı olarak) ve tercihen hem EC_{10} hem de EC_{20} rapor edilmelidir.

3. RAPORLAMA

3.1. Test Raporu

Test raporu aşağıdakileri içermelidir:

Test maddesi:
- fiziksel doğa ve fizikokimyasal özellikler, suda çözünürlük limiti dahil
- kimyasal tanımlama verisi (örneğin CAS no), saflığı dahil.

Test türleri:
- bilimsel ad, klon (eğer biliniyor ise) ve kaynak.

Test koşulları:
- kullanılan test prosedürü (statik, yarı statik ya da sürekli-akış),
- testin başlangıç tarihi ve süresi,
- test ortamı,
- deneysel tasarımın açıklanması: test kapları ve kapaklar, çözelti hacimleri, testin başlangıcındaki her test kabı için koloni ve yaprak sayısı,
- test derişimleri (uygun olan nominal ve ölçülmüş) ve her derişim için tekrar sayısı,
- stok ve test çözeltilerinin hazırlanma yöntemi, çözücü ya da dağıtıcıların kullanımı dahil,
- test esnasındaki sıcaklık,
- ışık kaynağı, ışık şiddeti ve homojenitesi,
- testin ve kontrol ortamının pH değerleri,
- test maddesi derişimleri ve uygun kalite değerlendirme verisi (geçerlilik çalışmaları, standart sapmalar ya da analizlerin güven sınırları) ile analiz yöntemleri,

- yaprak sayısının ve diğer ölçüm değişkenlerinin, örneğin kuru ağırlık, taze ağırlık ya da yaprak alanı, tayini için yöntemler,
- bu Test Yönteminden bütün sapmalar.

Sonuçlar:
- ham veri: analizin her gözlem ve durumundaki her test ve kontrol kabı için yaprak ve diğer ölçüm değişkenlerinin sayısı,
- her ölçüm değişkeni için ortalamalar ve standart sapmalar,
- her derişim için büyüme eğrileri (log dönüştürülmüş ölçüm değişkeni ile tavsiye edilen, bkz. bölüm 2.2.1, ikinci paragraf)
- yaprak sayısına dayanan kontroldeki iki katına çıkarma süresi/büyüme hızı,
- tekrarlamalar için ortalama değerler ve varyans katsayısı ile her muamele tekrarı için hesaplanmış tepki değişkenleri,
- derişim/etki ilişkisinin grafiksel gösterimi,
- tepki değişkenleri için, örneğin EC50, EC10, EC20, toksik bitiş noktalarının ve ortak güven aralıklarının tahminleri. Eğer hesaplanmış ise tayinleri için kullanılan LOEC ve/ veya NOEC ve istatiksel yöntemler,
- eğer ANOVA kullanılmış ise, tespit edilebilir etkinin boyutu (örneğin en küçük önemli fark),
- herhangi bir muamelede bulunan herhangi bir büyüme dürtüsü,
- test çözeltilerinin gözlemleri gibi herhangi fitotoksisitenin görünür işaretleri,
- bu Test Yönteminden sapmalardan kaynaklanan test sonuçlarının çıktıları üzerine olan etkileri içeren sonuçların tartışılması.

4. KAYNAKLAR

(1) OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test.

(2) The use of Lemna studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With Lemna gibba G3. E1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 BiologicalEffects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

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

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

(7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) Lemna minor, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Yöntem: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, Lemna minor. EPS 1/RM/37- 120 pp.

(9) : Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999). The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.
(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 23.
(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (Lemna minor) — Duckweed Growth Inhibition Test.
(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (Lemna minor L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (Lemna minor) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.
(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.
(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves.Env. Sci. Technol. 19, 713-718.
(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.
(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.
(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.
(20) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
(21) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
(22) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
(23) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.
(24) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28:510-531.
(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

Ek - I

Lemna spp.'nin açıklaması

Genellikle su mercimeği olarak anılan su bitkisi, Lemna spp. dört cins içinde dünya genelindeki türleri çok sayıda bulunduran Lemnaceae ailesine bağlıdır. Farklı görünümleri ve taksonomileri kapsamlı bir şekilde (1), (2)'de açıklanmaktadır. Lemna gibba ve L. minor, ılıman alanların temsili türleridir ve toksisite testleri için yaygın olarak kullanılırlar. Her iki tür de, su yüzeyinde ya da suyun altında disk şeklinde gövdeye (yaprak) sahiptir ve her yaprağının alt yüzeyinin merkezinden çok ince kökler çıkar. Lemna spp. nadiren çiçek üretir ve bitkiler, bitkisel olarak yeni yapraklar üreterek ürerler (3). Yaşça daha büyük olan bitkilerle karşılaştırma yapıldığında, daha genç olanlar daha solgun görünümde olmaya meyilli olup, daha kısa köklere sahiptir ve farklı boyutlarda iki ila üç yapraktan oluşur. Lemna'nın küçük boyutlu oluşu, basit yapısı, eşeysiz üremesi ve kısa üreme süresi, bu cinsin bitkilerini laboratuvar testi için çok uygun hale getirir (4), (5).

Hassasiyetteki olası cinsler arası değişkenlikten dolayı, türler içinde sadece hassasiyet karşılaştırması geçerli olur.

Test için kullanılmış olan Lemna türlerinin örnekleri: Tür Referansı

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga Ceramium strictum and the duckweed Lemna aequinoctialis in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.
Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of Lemna major as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.
Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., 'Public draft'. EPA 712-C-96-156. 8pp.
Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duck-weed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).
Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba*G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.
United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., 'Public draft'. EPA 712-C-96-156. 8pp.
Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). Lemna (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of
Lemna paucicostata to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (Lemna perpusilla). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.
Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.
Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.- Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Lemna türlerinin kaynakları

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel. +1-416-978-3641
Fax +1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
UNITED STATES
Tel. 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 Stockholm
SWEDEN
Tel. +46 86747240
Fax +46 86747636

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

Kaynaklar

(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.

Ek- II

Stok kültürün muhafazası

Stok kültürler, yeniden oluşturulmasına gerek olmadan daha uzun süreler boyunca düşük sıcaklıklar (4-10 °C) altında muhafaza edilebilir. Lemna büyüme ortamı test için kullanılan ortam ile aynı olabilir, fakat stok kültürler için diğer zengin besinli ortam kullanılabilir.
Periyodik olarak, bir miktar genç, açık yeşil bitkiler, aseptik teknik kullanılarak taze ortam içeren yeni kültür kaplarına taşınır. Burada tavsiye edilen daha soğuk koşullar altında, alt kültürleme, üç aya kadar olan zaman aralıklarında yürütülebilir.
Kimyasal olarak temiz (asitle yıkanmış) ve steril cam kültür kapları kullanılmalı ve aseptik tutma teknikleri uygulanmalıdır. Stok kültürün kirlenmesi, örneğin alg ya da mantar ile, durumunda, kirlenmeye neden olan organizmaları ortadan kaldırmak amacıyla adımlar atılması gereklidir. Bu, alg ve kirlenmeye neden olan diğer organizmaların çoğunun olması halinde, yüzey sterilizasyonu ile başarılabilir. Kirlenmiş bitki materyalinin bir numunesi alınır ve kökler kesilir. Daha sonra materyal temiz suda kuvvetli bir şekilde çalkalanır ve takiben 30 saniye ile 5 dakika arasında %0,5 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisi içinde tutulur. Daha sonra bitki materyali steril su ile yıkanır ve seriler halinde taze büyüme ortamı içeren kültür kaplarına aktarılır. Eğer özellikle daha uzun maruz kalma periyotları kullanılır ise bu muamelenin sonucu olarak birçok yaprak ölecektir, fakat hayatta kalanların bazıları genellikle kirlilikten arındırılmış olacaktır. Bunlar daha sonra, yeni kültürleri yeniden aşılamak amacıyla kullanılabilir.

Ek- III

Ortam

L. minor ve L. gibba için farklı büyüme ortamları tavsiye edilir. L. minör için modifiye edilmiş İsveç Standardı (SIS) ortamı tavsiye edilir iken, L. gibba için 20X AAP ortamı tavsiye edilir. Her iki ortamın bileşimi aşağıda verilmektedir. Bu ortamları hazırlar iken, belirteç ya da analitik saflıktaki kimyasallar ve deiyonize su kullanılmalıdır.

İsveç Standardı (SIS) Lemna büyüme ortamı

— Stok çözeltileri I-V, otoklavlama (120 oC, 15 dakika) ile ya da membran filtrasyonu (yaklaşık olarak 0,2 μm gözenek büyüklüğü) ile steril hale getirilir.

— Stok VI (ve isteğe bağlı olarak VII) sadece membran filtrasyonu ile steril hale getirilir, bunlar otoklavlanmamalıdır.

— Steril stok çözeltileri serin ve karanlık koşullar altında depolanmalıdır. Stok VI (ve isteğe bağlı olarak VII) bir aylık raf ömrüne sahip iken, stok I – V, altı aydan sonra atılmalıdır.

Stok çözelti No.	Madde	Stok çözeltideki derişim ($g \cdot l^{-1}$)	Hazırlanmış ortamdaki derişim ($mg \cdot l^{-1}$)	Hazırlanan ortam	
				Element	Derişim ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$ KH_2PO4	8,50 1,34	85 13,4	Na; N K; P	32; 14 6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	1,0 0,20 0,010 0,050 0,0050 0,010	1,00 0,20 0,010 0,050 0,0050 0,010	B Mn Mo Zn Cu Co	0,17 0,056 0,0040 0,011 0,0013 0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,17 0,28	0,84 1,4	Fe —	0,17 —
VII	MOPS (tampon)	490	490	—	—

— Bir litre SIS ortamı hazırlamak için, 900 ml deiyonize suya aşağıdakiler eklenir:
— 10 ml stok çözelti I
— 5 ml stok çözelti II
— 5 ml stok çözelti III
— 5 ml stok çözelti IV
— 1 ml stok çözelti V
— 5 ml stok çözelti VI
— 1 ml stok çözelti VII (isteğe bağlı olarak)

Not: Belirli test maddeleri için daha fazla stok çözelti VII (MOPS tampon) gerekli olabilir (bkz. bölüm 1.4, son paragraf).

— pH 0,1 ya da 1 mol HCl ya da NaOH ile 6,5 ± 0,2'ye ayarlanır ve hacim, deiyonize su ile bir litreye tamamlanır.

20X AAP büyüme ortamı

Stok çözeltiler, steril damıtık ya da deiyonize su içinde hazırlanır.
Steril stok çözeltiler serin ve karanlık koşullar altında depolanmalıdır. Bu koşullar altında stok çözeltilerin en az 6-8 hafta raf ömrü olacaktır.
Beş besin stok çözeltisi (A1, A2, A3, B ve C) 20X – AAP ortamı için, belirteç kalitesindeki kimyasallar kullanılarak hazırlanır. Büyüme ortamı oluşturmak için yaklaşık 850 ml deiyonize suya her besin stok çözeltisinin 20 ml'si, ilave edilir. pH 0,1 ya da 1 mol HCl ya da NaOH ile 7,5 ± 0,1'e ayarlanır ve hacim, deiyonize su ile bir litreye tamamlanır. Daha sonra ortam, 0,2 µm (yaklaşık olarak) membran filtreden geçirilerek steril haldeki kaba filtre edilir.
Teste yönelik büyüme ortamı, pH'ın kararlı hale gelmesine olanak sağlamak amacıyla kullanımdan 1-2 gün önce hazırlanmalıdır. Büyüme ortamının pH'ı, kullanımdan önce kontrol edilmelidir ve eğer gerekli ise yukarıda açıklandığı gibi 0,1 ya da 1 M NaOH ya da HCl eklenerek yeniden ayarlanmalıdır.

Stok çözelti No.	Madde	Stok çözeltideki derişim($g \cdot l^{-1}$) (*)	Hazırlanan ortamdaki derişim ($mg \cdot l^{-1}$) (*)	Hazırlanan ortam	
				Element	Derişim ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	-	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot L_1$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot L_{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Belirtilmemiş ise

Dipnot: Teorik olarak uygun final bikarbonat derişimi (pH ayarlamasını kayda değer bir şekilde önleyecek şekilde) 15 mg/l'dir; 300 mg/l değildir. Ancak bu yöntem için dolanıö testini de içeren 20X-AAP ortamın geçmişteki kullanımı300 mg/l'ye dayanır. (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.

STEINBERG ortamı (ISO 20079'dan sonra)

Derişimler ve stok çözeltiler
— Modifiye edilmiş Steinberg ortamı, ISO 20079'da sadece Lemna minör için (orada sadece Lemna minor'a izin verildiğinden) kullanılır, ancak iyi sonuçlar gösteren testlere Lemna gibba ile de ulaşılabilir.
— Ortam hazırlanır iken belirteç ya da analitik kalitede kimyasallar ve deiyonize su kullanılmalıdır.
— Stok çözeltilerden ya da çökme olmadan en yüksek ortam derişimine olanak sağlayan 10 kat konsantre edilmiş ortamdan besin ortamı hazırlanır.

Tablo 1

pH-kararlı hale getirilmiş STEINBERG ortamı (Altenburger'e modifiye edilmiş acc.)

Madde		Besin ortamı	
Makroelementler	mol ağırlığı	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroelementler	mol ağırlığı	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA Disodyum-dihidrat	372,24	1 500,00	4,03

Tablo 2

Stok çözeltiler (Makro elementler)

1. Makro elementler (50-kat konsantre edilmiş)	g/l
Stok çözelti1: KNO_3 KH_2PO_4 K_2HPO_4	 17,50 4,5 0,63
Stok çözelti2: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	 5,00
Stok çözelti3: $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	 14,75

Tablo 3

Stok çözeltiler (Mikro elementler)

2. Mikro elementler (50-kezkonsantre edilmiş)	mg/l
Stok çözelti 4: H_3BO_3	 120,0

Stok çözelti 5: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Stok çözelti6: $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Stok çözelti7: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Stok s çözelti8: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ EDTA disodyum-dihidrat	760,00 1 500,00

— Stok çözeltiler 2 ve 3 ve ayrı olarak 4 ila 7 toplanabilir (gereken derişimleri göz önünde bulundurarak).
— Daha uzun raf ömrü için stok çözeltiler 121 oC'de 20 dakika otoklav içinde muamele edilir ya da alternatif olarak steril filtrasyon (0,2 μm) yürütülür. Stok çözelti 8 için steril filtrasyon (0,2 μm) şiddetle tavsiye edilir.

STEINBERG ortamının final derişiminin hazırlanması (modifiye edilmiş)

— Çökmeyi önlemek amacıyla yaklaşık 900 ml deiyonize suya 20 ml stok çözelti 1, 2 ve 3 (bkz. tablo 2) eklenir.
— 1,0 ml stok çözelti 4, 5, 6, 7 ve 8 eklenir (bkz. tablo 3).
— pH 5,5 ± 0,2 olmalıdır (NaOH çözeltisi ya da HCl nin en düşük hacminin eklenmesi ile ayarlama yapılır).
— Su ile 1 000 ml'e ayarlanır.
— Eğer stok çözeltiler steril hale getirilmiş ve uygun su kullanılmış ise başka bir sterilizasyon gerekli değildir. Eğer final ortam ile sterilizasyon yapılmış ise stok çözelti 8 otoklavlamadan sonra (121 °C de 20 dakika) eklenmelidir.

Geçici depolama için 10 kat konsantre edilmiş STEINBERG ortamı (modifiye edilmiş) hazırlanması

— Çökmeyi önlemek amacıyla yaklaşık 30 ml suya 20 ml stok çözelti 1, 2 ve 3 (bkz. tablo 2) eklenir.Tetiklemeden kaçınmak için yaklaşık 30 ml deiyonize suya stok çözelti 1, 2 ve 3'ün (bkz. tablo 2) 20 ml'i eklenir.
— 1,0 ml stok çözelti 4, 5, 6, 7 ve 8 (bakınız tablo 3) eklenir. Su ile 100 ml'e ayarlanır.
— Eğer stok çözeltiler steril hale getirilmiş ve uygun su kullanılmış ise başka bir sterilizasyon gerekli değildir. Eğer final ortam ile sterilizasyon yapılmış ise stok çözelti 8 otoklavlamadan sonra (121 °C de 20 dakika) eklenmelidir.
— Ortam pH'ı (final derişim) 5,5 ± 0,2 olmalıdır.