

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA¹⁾

z dnia 13 maja 2004 r.

w sprawie warunków, w których uznaje się, że odpady nie są niebezpieczne

Na podstawie art. 4 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 27 kwietnia 2001 r. o odpadach (Dz. U. Nr 62, poz. 628, z późn. zm.²⁾) zarządza się, co następuje:

§ 1. Rozporządzenie określa:

- 1) warunki, w których uznaje się, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają właściwości lub składników i właściwości powodujących, że odpady te stanowią odpady niebezpieczne;
- 2) sposób ustalenia spełnienia warunków, o których mowa w pkt 1.

§ 2. 1. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają właściwości wybuchowych (H1), są negatywne wyniki badań wrażliwości termicznej, wrażliwości na uderzenie oraz wrażliwości na tarcie, przeprowadzonych w warunkach testowych.

2. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają właściwości szkodliwych (H5) albo toksycznych (H6), jest brak efektów szkodliwych lub toksycznych w warunkach prowadzonych testów przesiewowych z użyciem odpadów lub standardowego wyciągu wodnego z odpadów.

3. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają właściwości rakotwórczych (H7), jest brak wystąpienia nowotworów u badanych zwierząt narażonych na oddziaływanie tych odpadów w warunkach testowych.

4. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają szkodliwego działania na rozrodczość (H10), jest brak ich wpływu na rozwój rozwielitek w warunkach testowych lub brak oddziaływania na rozrodczość zwierząt doświadczalnych w warunkach testu jedno- lub dwupokoleniowego.

5. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają właściwości mutagennych (H11), jest brak zmian mutagennych u organizmów narażonych na oddziaływanie odpadów w warunkach testowych.

6. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają właściwości ekotoksycznych (H14), jest brak efektów toksycznych w warunkach prowadzonych testów przesiewowych z użyciem standardowego wyciągu wodnego z odpadów.

7. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają właściwości, z powodu których odpady te zostały umieszczone na tej liście, jest brak właściwości wymienionych w ust. 1-6 oraz brak przekroczeń parametrów granicznych, określonych w załączniku nr 1 do rozporządzenia.

§ 3. Ustalenie spełnienia warunków, o których mowa w § 2, następuje na podstawie przeprowadzonych badań, które prowadzą laboratoria akredytowane lub laboratoria posiadające wdrożony system jakości w zakresie badania właściwości i składników odpadów niebezpiecznych, określonych w załączniku nr 2 do rozporządzenia.

§ 4. Warunkiem uznania, że odpady wymienione na liście odpadów niebezpiecznych nie posiadają składników i właściwości, z powodu których odpady te zostały umieszczone na tej liście, jest:

- 1) brak przekroczeń stężeń składników określonych w załączniku nr 3 do rozporządzenia lub
- 2) brak przekroczeń parametrów granicznych określonych w załączniku nr 1 do rozporządzenia oraz brak cech określonych w § 2 ust. 1-6.

§ 5. Jeżeli wystąpi chociaż jedna z cech, o których mowa w § 2 ust. 1-6, i przekroczenie parametrów, o których mowa w załączniku nr 1 do rozporządzenia, odpad jest odpadem niebezpiecznym.

§ 6. Spełnienie warunku, o którym mowa w § 4 pkt 1, ustala się w następujących etapach:

- 1) etap pierwszy - ustalenie listy substancji, których występowanie w odpadzie jest spodziewane;
- 2) etap drugi - przeprowadzenie wstępnych badań, których celem jest ustalenie, czy faktycznie występują substancje, o których mowa w pkt 1;
- 3) etap trzeci - przeprowadzenie szczegółowych badań w celu określenia stężeń substancji ustalonych w etapie drugim.

§ 7. Jeżeli wyniki badań, o których mowa w § 6 pkt 3, wykazują, że stężenia substancji są niższe niż wymienione w załączniku nr 3 do rozporządzenia, odpad uznaje się za nieposiadający składników i właściwości powodujących, że odpady te stanowią odpady niebezpieczne.

§ 8. Jeżeli w wyniku ustaleń, o których mowa w § 6, zostanie ustalone występowanie składników wymienionych w załączniku nr 3 do ustawy z dnia 27 kwietnia 2001 r. o odpadach innych niż wymienione w załączniku nr 3 do rozporządzenia, to w celu stwierdzenia, czy odpad nie stanowi odpadu niebezpiecznego, przeprowadza się badania właściwości, o których mowa w § 2.

§ 9. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

¹⁾ Minister Środowiska kieruje działem administracji rządowej - środowisko, na podstawie § 1 ust. 1 pkt 2 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 4 maja 2004 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Środowiska (Dz. U. Nr 106, poz. 1130).

²⁾ Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2002 r. Nr 41, poz. 365, Nr 113, poz. 984 i Nr 199, poz. 1671, z 2003 r. Nr 7, poz. 78 oraz z 2004 r. Nr 96, poz. 959 i Nr 116, poz. 1208.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik nr 1

PARAMETRY GRANICZNE

Lp.	Oznaczenia właściwości	Nazwa właściwości	Parametr graniczny		
			nazwa parametru	jednostka	wartości, dla których uznaje się, że odpad nie posiada właściwości
1	H2	utleniające	maksymalna prędkość spalania	mm/s	maksymalna prędkość spalania mniejsza od maksymalnej prędkości spalania mieszanki kontrolnej celulozy i azotanu baru
2	H3-A	wysoco łatwopalne	temperatura zapłonu	°C	powyżej 21 dla odpadów ciekłych
			czas spalania substancji stałej	s	powyżej 45
3	H3-B	łatwopalne	temperatura zapłonu	°C	powyżej 55
4	H4	drażniące	odczyn odpadu ciekłego lub wyciągu wodnego odpadu stałego	pH	powyżej 3,0 oraz poniżej 11,5
			działanie na skórę - rumień skóry	-	0 ¹⁾
			działanie na skórę - obrzęk skóry	-	0 ¹⁾
			działanie na oczy	-	0 ²⁾
			uczulenie skóry	-	0 ³⁾
5	H8	żrące	odczyn odpadu ciekłego lub wyciągu wodnego odpadu stałego	pH	powyżej 2,0 oraz poniżej 12,5
			opór elektryczny przez skórę szczura	om	>5
			gęstość optyczna w teście z modelową skórą ludzką	%	100 ⁴⁾
6	H9	zakaźne ⁵⁾	Clostridium perfringens		>0,0001
			Salmonella sp.	obecność	brak
			Grupa coli, Eschericia coli	miano	>0,001
			Pseudomonas aeruginosa	obecność	brak
			inne organizmy	-	stosowanie do rodzaju organizmów
7	H12	uwalniające toksyczne i wysoko toksyczne gazy	prędkość wydzielania gazu	dm ³ /kg na godzinę	<1

			całkowita ilość wydzielonej substancji toksycznej	% masy odpadu	<3,0
			całkowita ilość wydzielonej substancji wysoce toksycznej	% masy odpadu	<0,1
			toksyczne oddziaływanie wydzielonego gazu na organizmy testowe	-	brak
8	H13	wydzielające substancje o właściwościach od H1 do H12	parametry stosowane dla poszczególnych właściwości od H1 do H12		stosowanie do badanych parametrów stosowanych do oceny poszczególnych właściwości

Objaśnienia:

- 1) Brak zaczerwienienia oraz brak obrzęku (ocena "0" w skali od 0 do 4).
- 2) Brak zmętnienia rogówki, spojówki i tęczówki oraz brak obrzęku powieki, oceny "0" (w skali: zmętnienie rogówki: 0-4; uszkodzenie tęczówki: 0-2, przekrwienie spojówki: 0-3, obrzęk powieki: 0-4).
- 3) Brak reakcji skórnych (ocena "0" w klasyfikacji Magnussona/Kligmana w skali od 0 do 3).
- 4) Odsetkowa wartość graniczna musi jednak zostać zdefiniowana w modelu prognostycznym, zanim metoda zostanie uznana za odpowiednią.
- 5) Odpady zawierające żywe mikroorganizmy lub ich toksyny, o których wiadomo lub co do których istnieją wiarygodne podstawy do przyjęcia, że powodują choroby człowieka lub innych żywych organizmów.

Załącznik nr 2

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI

Lp.	Nazwa właściwości	Nazwa metody ¹⁾
1	2	3
1	wybuchowe H ²⁾	<p>1.1. Badanie wrażliwości termicznej wg PN-92/C-86006 (Materiały wybuchowe - Oznaczenie deflagracyjności - Metoda ogrzewania w łusce stalowej) lub wg pkt 1.6.1 części A.14 załącznika³⁾</p> <p>1.2. Badanie wrażliwości na uderzenie wg PN-EN 13631-4:2004 (Materiały wybuchowe do użytku cywilnego. Materiały wybuchowe kruszące. Część 4: Oznaczanie wrażliwości na uderzenie) lub wg pkt 1.6.2 części A.14 załącznika³⁾</p> <p>1.3. Badanie wrażliwości na tarcie wg PN-C-86019:1994 (Materiały wybuchowe - Oznaczanie wrażliwości na tarcie) lub wg pkt 1.6.3 części A.14 załącznika³⁾</p>
2	utleniające H ₂	2.1. Badanie właściwości utleniających (substancji stałych/preparatów chemicznych) wg części A.17 załącznika ³⁾
3	wysoce łatwopalne H _{3A}	<p>3.1. Metody badania odpadów ciekłych⁴⁾</p> <p>3.1.1. Oznaczanie temperatury zapłonu metodą tygła zamkniętego wg Abela wg PN-EN ISO 13736:2002 (U) (Przetwory naftowe i inne ciecze - Oznaczanie temperatury zapłonu metodą tygła zamkniętego według Abela) lub wg pkt 1.6.3.2 części A.9 załącznika³⁾</p>

		<p>3.1.2. Oznaczanie temperatury zapłonu metodą zamkniętego tygla Pensky'ego-Martensa wg PN-EN ISO 2719:2003 Oznaczenie temperatury zapłonu. Pomiar metodą zamkniętego tygla Pensky'ego-Martensa) lub wg pkt 1.6.3.2 części A.9 załącznika³⁾</p> <p>3.1.3. Oznaczanie temperatury zapłonu w tyglu zamkniętym TAG wg PN-V-04043:2002 (Przetwory naftowe - Oznaczenie temperatury zapłonu w tyglu zamkniętym TAG) lub wg pkt 1.6.3.2 części A.9 załącznika³⁾</p> <p>3.1.4. Oznaczanie temperatury zapłonu metodą tygla zamkniętego Abla-Pensky'ego wg PN-EN 57:1999 (Produkty naftowe - Oznaczenie temperatury zapłonu - Pomiar metodą zamkniętego tygla Abla-Pensky'ego) lub wg pkt 1.6.3.2 części A.9 załącznika³⁾</p> <p>3.2. Metody badania odpadów stałych – Oznaczanie palności (substancji i parametrów chemicznych stałych) wg PN-EN 61300-2-36:2002 (Światłowodowe złącza i elementy bierne - Podstawowe procedury badań i pomiarów - Część 2-36: Badania - Palność (niebezpieczeństwo zapłonu)) lub wg części A.10 załącznika³⁾</p>
4	łatwopalne H3B ⁴⁾	<p>4.1. Oznaczanie temperatury zapłonu metodą tygla zamkniętego wg Abela jak w pkt 3.1.1</p> <p>4.2. Oznaczanie temperatury zapłonu metodą zamkniętego tygla Pensky'ego-Martensa jak w pkt 3.1.2</p> <p>4.3. Oznaczanie temperatury zapłonu w tyglu zamkniętym TAG jak w pkt 3.1.3</p> <p>4.4. Oznaczanie temperatury zapłonu metodą tygla zamkniętego Abla-Pensky'ego jak w pkt 3.1.4</p>
5	drażniące H4	<p>5A. Testy przesiewowe - Badanie pH odpadu ciekłego lub wyciągu wodnego z odpadu stałego wg PN-90/C- 04540.01 (Woda i ścieki. Badania pH, kwasowości i zasadowości. Oznaczanie pH wód i ścieków o przewodności elektrolitycznej właściwości 10 mikrosekund/cm i powyżej metodą elektrometryczną)</p> <p>5B. Badanie działania drażniącego: wykonywane wyłącznie w przypadkach szczególnie uprawnionych⁵⁾</p> <p>5B.1. Toksyczność ostra (działanie drażniące na skórę) wg części B.4 załącznika³⁾</p> <p>5B.2. Toksyczność ostra (działanie drażniące na oczy) wg części B.5 załącznika³⁾</p> <p>5B.3. Toksyczność ostra (uczulenie skóry) wg części B.6 załącznika³⁾</p>
6	szkodliwe H5 ⁶⁾	<p>6A. Testy przesiewowe:</p> <p>6A.1. Test toksyczności na bakteriach <i>Vibrio fischeri</i> wg instrukcji zawartych w dostępnych testach komercyjnych</p> <p>6A.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej na rzeźusze ogrodowej <i>Lepidium sativum</i> L.⁷⁾</p> <p>6A.3. Toksyczność ostra (dla rozwielitek - Daphnia sp.) wg części C.2 załącznika³⁾</p> <p>6A.4. Toksyczność - Hamowanie wzrostu glonów wg części C.3 załącznika³⁾</p> <p>6A.5. Toksyczność ostra (dla ryb) wg części C.1 załącznika³⁾</p> <p>6A.6. Toksyczność dla dżdżownic. Badania w sztucznej glebie wg części C.8 załącznika³⁾</p> <p>6B. Badania na ssakach: wykonywane wyłącznie w przypadkach szczególnie uprawnionych</p>

		<p>6B.1. Toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową). Metoda ustalonej dawki wg części B.1.BIS załącznika³⁾</p> <p>6B.2. Toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową). Metoda klas ostrej toksyczności wg części B.1. TRIS załącznika³⁾</p> <p>6B.3. Toksyczność ostra (inhalacyjna) wg części B.2 załącznika³⁾</p> <p>6B.4. Toksyczność ostra (narażenie przez skórę) wg części B.3 załącznika³⁾</p> <p>6B.5. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, droga pokarmowa) wg części B.7 załącznika³⁾</p> <p>6B.6. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, droga inhalacyjna) wg części B.8 załącznika³⁾</p> <p>6B.7. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, po podaniu na skórę) wg części B.9 załącznika³⁾</p>
7	toksyczne H6 ⁶⁾	<p>7A. Testy przesiewowe:</p> <p>7A.1. Test toksyczności na bakteriach <i>Vibrio fischeri</i> wg instrukcji zawartych w dostępnych testach komercyjnych</p> <p>7A.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej na rzeźusze ogrodowej <i>Lepidium sativum</i> L.⁷⁾</p> <p>7A.3. Toksyczność ostra (dla rozwielitek - Daphnia sp.) wg części C.2 załącznika³⁾</p> <p>7A.4. Hamowanie wzrostu glonów wg części C.3 załącznika³⁾</p> <p>7A.5. Toksyczność ostra (dla ryb) wg części C.1 załącznika³⁾</p> <p>7A.6. Toksyczność dla dżdżownic. Badania w sztucznej glebie wg części C.8 załącznika³⁾</p> <p>7B. Badania na ssakach: wykonywane wyłącznie w przypadkach szczególnie uprawnionych</p> <p>7B.1. Toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową). Metoda stałej dawki wg części B.1.BIS załącznika³⁾</p> <p>7B.2. Toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową). Metoda klas ostrej toksyczności wg części B.1. TRIS załącznika³⁾</p> <p>7B.3. Toksyczność ostra (inhalacyjna) wg części B.2 załącznika³⁾</p> <p>7B.4. Toksyczność ostra (narażenie przez skórę) wg części B.3 załącznika³⁾</p> <p>7B.5. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, droga pokarmowa) wg części B.7 załącznika³⁾</p> <p>7B.6. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, droga inhalacyjna) wg części B.8 załącznika³⁾</p> <p>7B.7. Toksyczność dawki powtarzanej (28 dni, po podaniu na skórę) zgodnie z częścią B.9 załącznika³⁾</p>
8	rakotwórcze H7	<p>8.1. Obserwacja działania rakotwórczego na zwierzętach testowych wg części B.32 załącznika³⁾</p> <p>8.2. Obserwacja toksyczności przewlekłej i działania rakotwórczego na zwierzętach testowych lub metoda równoważna wg części B.33 załącznika³⁾</p>
9	żrące H8	<p>9A. Testy przesiewowe - Badanie pH odpadu ciekłego lub wyciągu wodnego z odpadu wg PN-90/C-04540.01 (Woda i ścieki - Badania pH, kwasowości i zasadowości. Oznaczanie pH wód i ścieków o przewodności elektrolitycznej właściwej 10 mikrosekund/cm i powyżej metodą elektrometryczną)</p> <p>9B. Badanie działania żrącego</p> <p>9B.1. Działanie żrące na skórę (test TER z użyciem skóry szczura) wg pkt 1.5 części B.40 załącznika³⁾ lub</p>

		9B.2. Działanie żrące na skórę (test na modelu skóry ludzkiej) wg pkt 1.7 części B.40 załącznika ³⁾
10	zakaźne H9 ⁸⁾	<p>10.1. Oznaczenie bakterii z rodzaju Clostridium wg PN- EN 26461-1:2001 (Jakość wody. Wykrywanie i oznaczanie ilościowe przetrwalników beztlenowców redukujących siarczyny (clostridia). Część 1: Metoda namnażania w podłożu płynnym)</p> <p>10.2. Oznaczenie bakterii z rodzaju Pseudomonas aeruginosa wg PN 81/C-04615.26 (Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie bakterii Pseudomonas aeruginosa metodą hodowli na pożywkach płynnych)</p> <p>10.3. Oznaczenie bakterii z rodzaju Salmonella wg PN-EN ISO 6579:2003 (Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania Salmonella spp).</p> <p>10.4. Oznaczenie bakterii z grupy coli, Escherichia coli wg PN 75/C-04615.05 (Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie bakterii grupy coli metodą fermentacyjną probówkową), PN 77/C- 04615.07 (Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie bakterii grupy coli typu kałowego (fekalnego) metodą fermentacyjną probówkową), PN-EN ISO 9308-1:2004 (Jakość wody. Wykrywanie i oznaczanie ilościowe Escherichia coli i bakterii z grupy coli. Część 1: Metoda filtracji membranowej)</p> <p>10.5. Oznaczenie innych mikroorganizmów metodami specyficznymi dla ich rodzajów</p>
11	działające szkodliwie na rozrodczość H10 ⁹⁾	<p>11A. Test przesiewowy - Badanie wpływu na rozwój rozwiłitek¹⁰⁾</p> <p>11B. Badania na zwierzętach: wykonywane wyłącznie w przypadkach szczególnie uprawnionych</p> <p>11B.1. Działanie toksyczne na rozrodczość w warunkach testu jednopokoleniowego wg części B.34. załącznika³⁾ lub</p> <p>11B.2. Działanie toksyczne na rozrodczość w warunkach testu dwupokoleniowego wg części B.35. załącznika³⁾</p>
12	mutagenne H11 ¹¹⁾	<p>12A. Testy na organizmach niższych i komórkach ssaków:</p> <p>12A.1. Mutagenność (test rewersji mutacji na bakteriach) wg części B.13/14 załącznika³⁾</p> <p>12A.2. Mutagenność (test mutacji genowych na komórkach Saccharomyces cerevisiae) wg części B.15 załącznika³⁾</p> <p>12A.3. Mutagenność (test rekombinacji mitotycznych na komórkach Saccharomyces cerevisiae) wg części B.16 załącznika³⁾</p> <p>12A.4. Recesywne mutacje letalne związane z płcią u Drosophila melanogaster wg części B.20 załącznika³⁾</p> <p>12A.5. Mutagenność - (test mutacji genowych na komórkach ssaków) wg części B.17 załącznika³⁾ lub</p> <p>12A.6. Test wymiany chromatyd siostrzanych in vitro wg części B.19 załącznika³⁾, lub</p> <p>12A.7. Mutagenność (test aberracji chromosomowych in vitro na komórkach ssaków) wg części B.10 załącznika³⁾</p> <p>12A.8. Mutagenność (test aberracji chromosomowych na komórkach szpiku kostnego ssaków) wg części B.11 załącznika³⁾</p> <p>12A.9. Mutagenność (test mikrojądrocy na erytrocytach ssaków in vivo) wg części B.12 załącznika³⁾</p> <p>12B. Badania na ssakach: wykonywane wyłącznie w przypadkach szczególnie uprawnionych</p>

		<p>12B.1. Dominujące mutacje letalne u gryzoni wg części B.22 załącznika³⁾ lub</p> <p>12B.2. Aberracje chromosomowe spermatogoniów ssaków wg części B.23 załącznika³⁾, lub</p> <p>12B.3. Test plamkowy u myszy wg części B.24 załącznika³⁾, lub</p> <p>12B.4. Test dziedzicznych translokacji u myszy wg części B.25 załącznika³⁾</p>
13	uwalniające toksyczne i wysoko toksyczne gazy H12	<p>Metoda badania dwuetapowa:</p> <p>13.A. I etap - Badanie palności (w kontakcie z wodą) wg części A.12 załącznika³⁾</p> <p>13.B. II etap - tylko wówczas, gdy w etapie I nie jest możliwe ustalenie nazwy chemicznej wydzielającego się gazu</p> <p>13.B.1. Toksyczność ostra (inhalacyjna) wg części B.2 załącznika³⁾ lub</p> <p>13.B.2. Toksyczność dawki powtarzalnej (28 dni, droga inhalacyjna) wg części B.8 załącznika³⁾</p>
14	H13 - wydzielające substancje o właściwościach od H1 do H12	Jak dla właściwości od H1 do H12
15	ekotoksyczne H14 ¹²⁾	<p>15.1. Testy ekotoksyczności wg instrukcji zawartych w poszczególnych testach komercyjnych z wykorzystaniem bakterii luminescencyjnych, glonów, pierwotniaków, wrotków i skorupiaków dostępnych w handlu w formie Toxkitów</p> <p>15.2. Hamowanie wzrostu glonów wg części C.3 załącznika³⁾</p> <p>15.3. Toksyczność ostra (dla rozwielitek - Daphnia sp.) wg części C.2 załącznika³⁾</p> <p>15.4. Toksyczność ostra (dla rzęsy wodnej - Lemna minor)¹³⁾</p> <p>15.5. Toksyczność ostra (dla ryb) wg części C.1 załącznika³⁾</p>

Objaśnienia:

¹⁾ Wykonanie badania według opisu metody określonej w:

- a) załączniku do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 28 lipca 2003 r. w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych (Dz. U. Nr 232, poz. 2343),
- b) normach polskich (europejskich),
- c) innych udokumentowanych procedurach (patrz: objaśnienia w odnośnikach 7, 10 i 13).

W testach, w których metodyki opisane w załączniku, o którym mowa w lit. a, lub innych procedurach przewidują użycie wodnych roztworów badanych substancji, w badaniach odpadów stosuje się standardowe wyciągi wodne z odpadów, wykonane zgodnie z PN-Z-15009:1997 (Odpady stałe - Przygotowanie wyciągu wodnego) lub PN-Z-15012:1997 (Odpady stałe - Przygotowanie wyciągu wodnego z odpadów zaolejonych).

We wszystkich badaniach, a w szczególności w badaniach toksykologicznych, należy stosować w pierwszej kolejności metody przesiewowe, tj. analizy chemiczne oraz mikrobiologiczne z zastosowaniem mikroorganizmów oraz organizmów niższych, z uwzględnieniem podanych niżej zasad. Metody te oznaczone są symbolem A w opisie metod badania poszczególnych właściwości.

²⁾ Badania wykonuje się wszystkimi wymienionymi metodami.

³⁾ Załącznik do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 28 lipca 2003 r. w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych.

⁴⁾ Wykonuje się badanie przynajmniej jedną z wymienionych metod.

⁵⁾ Wybór metody powinien być dostosowany do przewidywanej drogi narażenia.

⁶⁾ Do ustalenia, czy odpad posiada właściwości H5 lub H6, należy w pierwszej kolejności wykonać testy przesiewowe na bakteriach oraz takich organizmach, jak *Lepidium sativum* L., *Daphnia* sp., *Eisenia foetida*, ryby. Model badawczy powinien składać się minimum z dwóch testów, z których jednym powinien być test na rybach. W przypadku gdy w testach przesiewowych zostanie wykazana szkodliwość lub toksyczność badanego wyciągu wodnego z odpadów, wyniki mogą zostać dalej potwierdzone, o ile istnieje taka konieczność, w badaniach na ssakach.

7) Wykonanie wg następującego opisu metody - Oznaczenie aktywności cytotoksycznej na rzeżusze ogrodowej *Lepidium sativum* L.

1. Wstęp

1.1. Cel

Celem badania jest określenie, czy odpad wykazuje aktywność cytotoksyczną na rzeżusze ogrodowej *Lepidium sativum* L.

1.2. Zakres stosowania metody

Metodę należy stosować do wstępnej oceny mającej za zadanie określenie, czy badany odpad wykazuje właściwości mitodepresyjne, objawiające się hamowaniem podziałów komórkowych organizmu testowego.

1.3. Określenia:

- a) widoczna toksyczność - ogólne określenie opisujące wyraźne objawy toksyczności występujące po podaniu badanej substancji. Powinny one być wystarczające do oszacowania zagrożenia i powinny być takie, by można było oczekiwać, że wzrost podanej dawki spowoduje zmiany intensywności objawów toksyczności i prawdopodobnie śmiertelność.
- b) NER_5 - najwyższe rozcieńczenie wodnego wyciągu z odpadu, który hamuje wydłużenie się korzeni o 5 % w stosunku do kontroli,
- c) NER_{50} - najwyższe rozcieńczenie wodnego wyciągu z odpadu, który hamuje wydłużenie się korzeni o 50 % w stosunku do kontroli,
- d) NER_{90} - najwyższe rozcieńczenie wodnego wyciągu z odpadu, który hamuje wydłużenie się korzeni o 90 % w stosunku do kontroli,
- e) LID (Lowest Ineffective Dilution) - najmniejsze nieefektywne rozcieńczenie.

1.4. Wytyczne ogólne

Naczynia do hodowli i szkło laboratoryjne należy myć wodnym roztworem detergentu, a następnie dokładnie płukać i sterylizować.

1.5. Zasada metody

Oznaczenie aktywności cytotoksyczności na rzeżusze ogrodowej *Lepidium sativum* L. polega na obserwacji reakcji organizmów testowych umieszczonych w badanych wyciągach wodnych odpadów. W etapie pierwszym określanym jako test wstępny ustalany jest rząd toksyczności wykorzystywany w etapie drugim zwanym testem właściwym, na podstawie którego określane są wartości następujących parametrów: NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID.

1.6. Odczynniki i roztwory:

- a) woda destylowana lub zdemineralizowana,
- b) wodny roztwór detergentu,
- c) salicylan sodowy,
- d) siarczan cynkowy,
- e) fenol,
- f) czerwień rutenowa (lub czerwień obojętna).

1.7. Aparatura i przyrządy:

- a) urządzenia laboratoryjne do mieszania i rozcieńczenia pożywki,
- b) źródło wody demineralizowanej lub destylowanej,
- c) autoklaw,
- d) pH-metr,
- e) lupa binokularowa z przyrządem mikrometrycznym o dokładności 0,1 mm,
- f) termostat,
- g) ezy lub inne narzędzia używane do przenoszenia nasion rzeżuchy,
- h) naczynia z czystego szkła lub plastiku (najlepsze naczynie to szalka Petriego o średnicy 10 cm).

2. Wybór i przygotowanie organizmów testowych

2.1. Charakterystyka organizmu testowego

Roślina o wysokości 30-60 cm, naga, posiada białe kwiaty. Łuszczyнки szeroko oskrzydłone, opatrzone bardzo krótką szyjką, nieprzewyższającą wycięcia szczytowego łuszczyńki.

2.2. Uzyskiwanie i wybór organizmu testowego

Nasiona rzeżuchy ogrodowej *Lepidium sativum* L. lub roślina mogą być uzyskane ze źródeł komercyjnych lub laboratoriów badawczych. Organizm testowy musi być bezbłędnie zidentyfikowany i zatwierdzony taksonomicznie przed użyciem.

2.3. Laboratoryjna hodowla organizmów testowych

2.3.1. Uzyskiwanie i przygotowanie organizmów do testów

Nasiona rzeżuchy należy wysiać na bibułę zwilżoną wodą destylowaną lub wodą zdemineralizowaną. Inkubować w cieplarni w temperaturze $25 \pm 0,5$ °C przez 17-24 h.

2.3.2. Selekcja organizmów do testów

Do badań stosowane są tylko te organizmy w ilości 25 sztuk na jedno stężenie, u których wzrost korzeni po 17-24 h kiełkowania wynosi około 1 mm.

2.3.3. Woda do przygotowania roztworów potrzebnych do analizy

Do przygotowania roztworów do analizy wykorzystywana jest woda destylowana (zdemineralizowana).

2.3.4. Oświetlenie

Podczas inkubacji i w czasie trwania testu wskazany jest brak oświetlenia.

2.3.5. Temperatura

Podczas inkubacji i w czasie trwania testu wskazane jest utrzymywanie temperatury na poziomie $25 \pm 0,5$ °C.

3. Metodyka wykonania testu

3.1. Wytyczne ogólne

W testach przesiewowych należy użyć ustalonych z góry stężeń, by ustalić, czy próbka jest toksyczna w porównaniu z roztworem kontrolnym; jeżeli próbka jest toksyczna, należy wykonać test wstępny, który ma na celu ustalenie rzędu toksyczności badanych wyciągów wodnych odpadów.

Do testu należy używać naczyń z czystego szkła lub tworzywa sztucznego; najlepszym naczyniem jest szalka Petriego o średnicy 10 cm; przed użyciem każde naczynie należy dokładnie umyć wodnym roztworem detergentu, a następnie dokładnie 3 razy płukać wodą wodociągową, 1 raz wodą destylowaną; ezy lub inne narzędzie używane do przenoszenia nasion rzeżuchy powinny zostać usunięte po użyciu lub starannie umyte i wysterylizowane przed ponownym użyciem.

Parametry testu - warunki środowiskowe powinny odpowiadać tym, jakie panują podczas przygotowania organizmów testowych (ust. 2).

Utrwalanie i wybarwienie strefy korzeniowej - po inkubacji w celu utrwalenia badanego materiału szkiełkowane nasiona rzeżuchy należy przenieść do utrwalacza o następującym składzie:

- salicylan sodowy - 2,0 g
- siarczan cynkowy - 2,0 g
- fenol - 0,5 g
- woda destylowana - 100,00 cm³

czas utrwalania wynosi 1/2 godziny lub dłużej; po tym czasie kiełki należy przemyć w wodzie, a następnie włożyć do roztworu czerwieni rutenowej w stosunku 1:5.000 na szkiełku przedmiotowym, w celu wybarwienia strefy korzeniowej; do wybarwienia może być również zastosowana czerwień obojętna, ale daje gorsze rezultaty. Pomiarów długości korzeni dokonuje się pod lupą binokularową przy użyciu przyrządu mikrometrycznego z dokładnością do 0,1 mm.

3.2. Test wstępny

Test ten powinien być przeprowadzany w celu ustalenia, czy test ostateczny jest potrzebny, i po to, aby określić rozcieńczenie roztworów dla testu ostatecznego. W testach ustalania rzędu toksyczności wykonuje się próby wstępne, sporządzając szereg rozcieńczeń badanych wyciągów wodnych z zastosowaniem ilorazu postępu geometrycznego równego 5.

3.3. Test właściwy

Celem tego testu jest określenie NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID dla wzrostu korzenia rzeżuchy.

3.3.1. Metodyka wykonania testu:

a) do testu należy przygotować, na bazie uzyskanych wyników z testu wstępnego, 5 rozcieńczeń próbki (nie licząc kontroli) o malejącym rozcieńczeniu, przy zastosowaniu ilorazu postępu geometrycznego rozcieńczeń od 0,5 do 2,0; w analizie uwzględnia się te rozcieńczenia wyciągu wodnego, które w sposób statystycznie istotny ($L = 0,05$) hamują wzrost (wydłużenie się) korzeni w stosunku do prób kontrolnych; (najlepiej przygotować serię rozcieńczeń, w których środkowe powoduje około 50 % inhibicję wzrostu, a najniższe i najwyższe skutkują około 90 i 10 % efektem inhibicji),

b) dla każdego rozcieńczenia i kontroli powinny być wykonane co najmniej 3 powtórzenia, każde zawierające 10 cm³ badanego roztworu,

c) wprowadzić kontrolę negatywną zawierającą jedynie wodę lub 1 % metylocelulozę.

3.3.2. Wyniki testu

Pod wpływem związków cytotoksycznych występuje inhibicja procesów podziałowych komórek merystomatycznych, co prowadzi do zahamowania wzrostu organów rzeżuchy ogrodowej *Lepidium sativum* L. W teście bierze się pod uwagę długość korzeni badanego organizmu. Jeżeli w wysokich rozcieńczeniach występuje stymulacja, a nie inhibicja wzrostu rzeżuchy, należy zanotować to zjawisko, jeżeli ma miejsce.

4. Obliczanie wyników oznaczenia

4.1. W testach przesiewowych kluczowym pytaniem jest, czy próbka jest toksyczna, czy stymulująca w porównaniu z próbą kontrolną.

4.2. Toksyczność (lub stymulację) należy określić jako procent inhibicji (lub stymulacji) w odniesieniu do kontroli:

$$\% I = 100 \times (L_k - L_t) / L_k, \text{ gdzie:}$$

L_k i L_t są średnimi długościami korzeni odpowiednio w kontroli i próbie testowej; otrzymane wyniki służą do obliczenia NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID.

4.3. Między logarytmami rozcieńczeń związków i efektem działania występuje w przybliżeniu rozkład normalny, do obliczeń stosuje się przybliżoną metodą statystyczną wg Kadłubowskiego; wyniki dzielone są na dwie grupy o inhibicji mniejszej i większej od 50 %, po czym obliczane są średnie dla tych grup.

4.4. Należy określić NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID oraz wartość S_{20} za pomocą metody statystycznej lub graficznej; nachylenie zależności rozcieńczenie-reakcja jest specyficzne dla danego odpadu i dlatego może być cenną informacją.

5. Kontrola jakości

Negatywna próbka kontrolna jest konieczna do kontroli jakości. Test jest nie do zaakceptowania, jeżeli więcej niż 10 % kontrolnych osobników wykazuje zmiany patologiczne.

⁸⁾ Dla odpadów, co do których istnieje podejrzenie, że zawierają czynniki zakaźne, należy wytypować mikroorganizmy wskaźnikowe reprezentujące grupę organizmów odpowiedzialnych za tę właściwość odpadów. W badaniach tych zaleca się, zgodnie z wybraną grupą wskaźnikową, wykorzystanie testów dotyczących jakościowej analizy bakterii. Decyzja o wyborze grupy poszukiwanych drobnoustrojów powinna być podejmowana z udziałem laboratorium rekomendującego się doświadczeniem w mikrobiologicznych badaniach środowiskowych.

⁹⁾ Podstawowy jest test z rozwiłtkami.

¹⁰⁾ Wykonanie wg następującego opisu metody - Badanie wpływu na rozród rozwiłtek (*Daphnia magna*)

1. Wstęp

1.1. Cel

Celem badania jest określenie wpływu wyciągu wodnego badanych odpadów na rozród rozwiłtek (*Daphnia magna*).

1.2. Zasada metody

Rozwiłtki umieszcza się w wyciągu wodnym badanego odpadu w różnych rozcieńczeniach. Notowana jest liczba urodzonych osobników w przeliczeniu na jedną samicę, która przeżyła kontakt z badaną próbą. Tę liczbę następnie porównuje się z potencjałem rozrodczym rozwiłtek z próbek kontrolnych.

2. Charakterystyka organizmu testowego

Dafnie sp. są małymi słodkowodnymi skorupiakami o ciele spłaszczonym bocznie, pokrytym, z wyjątkiem głowy, przezroczystym pancerzem, zakończonym kolcem. Na głowie znajdują się ciemno pigmentowane, ruchliwe oko oraz krótkie czułki pełniące funkcję lokomotoryczną. Dzięki przezroczystości pancerza widoczne są niektóre narządy wewnętrzne.

2.1. Uzyskiwanie i wybór organizmu testowego

Daphnia sp. może być uzyskana ze źródeł komercyjnych, laboratoriów badawczych lub z terenu naturalnego. Od 20 do 30 rozwiłtek wystarczy do założenia hodowli. Organizm musi być bezbłędnie zidentyfikowany i zatwierdzony taksonomicznie przed użyciem.

2.2. Określenia

a) NER - najwyższe rozcieńczenie wodnego wyciągu z odpadu, które działa szkodliwie na rozrodczość,

b) LID (Lowest Ineffective Dilution) - najmniejsze nieefektywne rozcieńczenie.

2.3. Laboratoryjna hodowla organizmów testowych

Hodowle należy prowadzić zgodnie z metodyką zawartą w rozdz. C.2 załącznika (patrz: objaśnienia w odnośniku 1 pkt a).

2.4. Pokarm i sposób karmienia organizmów testowych

Rozwiłtki należy karmić mieszaniną zielonych glonów i drożdżami. Najlepiej, jeśli w skład glonów wchodzić będą *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* i ewentualnie *Chlorella sp.*

2.4.1. Mieszanina glonów z drożdżami; aby przygotować mieszaninę glonów, należy je odwirować, przepłukać w przefiltrowanej wodzie ze zbiornika naturalnego (wodę przepuścić przez filtr 0,22 μ m) lub w przefiltrowanej pożywce, na której rosną glony, i ponownie odwirować; należy pamiętać, że

podawanie pokarmu w nadmiarze może powodować wyczerpywanie się tlenu, a następnie śmierć organizmów;

rozwiłtiki należy karmić, używając sterylnej pipety Pasteura, dodając:

- do organizmów □ 9 do 10 dni - 2 krople każdego glonów i drożdży,
- do organizmów 9- □ 10-dniowych - 1 kroplę każdego glonów i drożdży,

na dwa dorosłe osobniki, zaokrąglając, jeżeli jest nieparzysta ilość rozwiłtek; na koniec tygodnia pracy (np. w piątek) dodać 1 dodatkową kroplę każdego glonów i drożdży na każdą zlewkę z hodowlą; jeżeli tylko 2 z 3 gatunków glonów są wykorzystywane do karmienia, należy dodać proporcjonalnie więcej z tych 2 glonów.

2.4.2. Karmienie jednym gatunkiem glonów; 7-dniowa hodowla glonów np. *Selenastrum capricornutum* powinna zawierać 4-5 mln komórek w 1 cm³; należy zmieszać 7-dniową hodowlę glonów z hodowlą 3-dniową w stosunku objętościowym 2:1; wirować komórki glonów, a następnie zawiesić je w wodzie wodociągowej średnio twardej lub twardej tak, aby w 1 cm³ było w przybliżeniu 10 mln komórek; dziennie należy dostarczyć rozwiłtkom w przybliżeniu 300.000 komórek glonów na 1 cm³ hodowli, czyli dodać ok. 30 cm³ zawiesiny komórek do 1 dm³ hodowli.

3. Metodyka wykonania testu

3.1. Test trwa 21 dni, czyli 5 wylęgów.

3.2. Liczba zwierząt używanych do badania wynosi 60 sztuk.

3.3. Osobniki umieszcza się pojedynczo w 100 cm³ zlewce z 60-80 cm³ testowanego roztworu; wykonuje się 10 powtórzeń dla pięciu testowanych stężeń oraz 10 prób kontrolnych; co 2 lub 3 dni należy policzyć osobniki, które przeżyły, i nowo narodzone; potem dorosłe osobniki przenosi się do świeżego roztworu testowanej substancji, a młode usuwa się.

4. Obliczanie wyników oznaczenia

Danych uzyskanych w wyniku badania reprodukcji używa się do określenia największego rozcieńczenia wyciągu wodnego odpadu potrzebnego do wywołania szkodliwego efektu (NER) oraz najmniejszego rozcieńczenia niepowodującego możliwego do zaobserwowania efektu (LID). Porównuje się liczbę urodzonych osobników w przeliczeniu na samice, która przeżyła kontakt z testowaną substancją, z potencjałem rozrodczym osobników użytych do badania kontrolnego.

¹¹⁾ Podstawowe testy przesiewowe należy wykonać na bakteriach, liniach komórkowych ssaków lub komórkach drożdży. Model badawczy powinien składać się z dwóch testów, tj. jednego na komórkach prokariotycznych i jednego na komórkach eukariotycznych.

¹²⁾ Należy wykonać testy na bakteriach, na formach młodocianych bezkręgowców i glonów (zestawy komercyjne), oraz na żywych organizmach roślinnych *Lemna minor* i zwierzęcych, takich jak *Daphnia* sp., ryby. Model badawczy powinien składać się z testów dla organizmów na różnych poziomach troficznych.

¹³⁾ Wykonanie wg następującego opisu metody - Oznaczenie toksyczności ostrej na rzęsie wodnej *Lemna minor*.

1. Wstęp

1.1. Cel

Celem badania jest określenie wysokości stężeń toksycznych wyciągu wodnego badanych odpadów na rzęsie wodnej *Lemna minor*.

1.2. Zakres stosowania metody

Metodę należy stosować do badania fitotoksyczności badanych odpadów na rzęsie, która jest idealnym organizmem do tego typu badania. Ponieważ większość wyciągów wodnych jest barwnych i/lub mętnych, przez co sprawiają trudności w badaniu toksyczności z użyciem glonów bez uprzedniego przesączenia, które obniża integralność próbki. W dodatku niektóre próbki zawierają labilne składniki i wymagają metod odnawialnych lub przepływowych. Testy na glonach mogą być nieodpowiednie do takich próbek, podczas gdy toksyczność badana na rzęsie może być łatwo modyfikowana innymi metodami.

Test toksyczności na rzęsie wodnej jest przydatny, szczególnie do określania fitotoksyczności na powierzchni rozdziału powietrze-woda, gdzie substancje powierzchniowo czynne, oleje i tłuszcze oraz toksyczne organiczne związki mogą się gromadzić. Test ten jest też użyteczny do określania toksyczności metali, związków organicznych, ścieków przemysłowych i miejskich. Ogólnie jest określany jako prosty, czuły i wydajny test.

1.3. Określenia:

- a) toksyczność ostra - obejmuje szkodliwe skutki występujące w określonym czasie po podaniu pojedynczej dawki wyciągu,
- b) widoczna toksyczność - ogólne określenie opisujące wyraźne objawy toksyczności; powinny one być wystarczające do oszacowania zagrożenia i powinny być takie, by można było oczekiwać, że obniżenie rozcieńczenia spowoduje zmiany intensywności objawów toksyczności i prawdopodobnie śmiertelność,

- c) NER_5 - najwyższe rozcieńczenie wodnego wyciągu z odpadu, który hamuje wydłużenie się korzeni o 5 % w stosunku do kontroli,
- d) NER_{50} - najwyższe rozcieńczenie wodnego wyciągu z odpadu, który hamuje wydłużenie się korzeni o 50 % w stosunku do kontroli,
- e) NER_{90} - najwyższe rozcieńczenie wodnego wyciągu z odpadu, który hamuje wydłużenie się korzeni o 90 % w stosunku do kontroli,
- f) LID (Lowest Ineffective Dilution) - najmniejsze nieefektywne rozcieńczenie,
- g) S_{20} - największa wartość czynnika rozcieńczającego, dla którego stwierdza się 20 % efekt stymulacji.

1.4. Wytyczne ogólne

1.4.1. Naczynia do hodowli i szkło laboratoryjne należy myć wodnym roztworem detergentu, a następnie dokładnie płukać.

1.4.2. Używać statycznych, odnawialnych lub przepływowych metod. Zwykle, jeśli roztwór jest stabilny (np. roztwór z małą ilością mikroorganizmów, wysokim stężeniem toksycznych metali lub małej lotności), używa się testu statycznego. Jeżeli próbki są niestabilne, użyć odnawialnej (codziennie) lub przepływowej metody.

1.5. Zasada metody

Oznaczenie fitotoksyczności na rzęsie wodnej Lemna minor polega na obserwacji reakcji organizmów testowych umieszczonych w wyciągu wodnym badanych odpadów. W etapie pierwszym określanym jako test wstępny ustalany jest rząd toksyczności wykorzystywany w etapie drugim zwanym testem właściwym, na podstawie którego określane są wartości następujących parametrów: NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID oraz wartość S_{20} .

1.6. Odczynniki i roztwory:

- a) roztwór podstawowy A:
 - $NaNO_3$
 - $NaHNO_3$
 - K_2HPO_4 ,
- b) roztwór podstawowy B:
 - $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
 - $MgCl_2$
 - $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$
 - $MnCl_2$,
- c) roztwór podstawowy C:
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
 - H_3BO_3
 - $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
 - $ZnCl_2$
 - $CoCl_2$
 - $CuCl_2$,
- d) woda demineralizowana lub destylowana,
- e) wodny roztwór detergentu.

1.7. Aparatura i przyrządy:

- a) urządzenia laboratoryjne do mieszania i rozcieńczania pożywki,
- b) źródło wody demineralizowanej lub destylowanej,
- c) autoklaw,
- d) pH-metr,
- e) ręczny obiektyw lub mikroskop selektywny,
- f) akwaria hodowlane - 15 l naczynia (np. akwarium) lub nierdzewna stalowa miska,
- g) lodówka,
- h) oświetlenie zapewniające stałe białe jarzeniowe światło (2.150-4.300 luksów),
- i) ezy lub inne narzędzia używane do przenoszenia rzęsy,
- j) 250 cm³ szklane zlewki lub kolbki Erlenmayera (dość duże, aby zmieścić 150 cm³ roztworu testowego i kolonie rzęsy); uwaga: wszystkie naczynia powinny być tego samego typu i wielkości;
- k) aparatura do pomiarów fizykochemicznych testowanych substancji chemicznych lub ich mieszanin.

2. Wybór i przygotowanie organizmów testowych

2.1. Charakterystyka organizmu testowego

Drobna roślina wodna o płaskich, bezlistnych kolistych pędach lub odwrotnie jajowatych średnicy 2-3 mm złożonych z części tzw. polci z korzonkami. Rzadko spotykane - kwiaty jednopłciowe bez okwiatu; męski z jednego precیکا, żeński z jednego słupka.

2.2. Uzyskiwanie i wybór organizmu testowego

Rzesa wodna Lemna minor może być uzyskana ze źródeł komercyjnych, laboratoriów badawczych lub z terenu naturalnego. Organizm musi być bezbłędnie zidentyfikowany i zatwierdzony taksonomicznie przed użyciem. Innym, preferowanym przez niektórych biologów gatunkiem rzęsy jest *L. gibba*, *L. perpusilla*, *L. pencicostata*, *L. polyrrhiza*, które mogą być używane z sukcesem po modyfikacjach procedury.

2.3. Laboratoryjna hodowla organizmów testowych

2.3.1. Hodowla organizmów testowych

Środowisko wzrostu roślin w warunkach kontrolnych powinno być prowadzone w odpowiednich pomieszczeniach lub na zamkniętych obszarach umożliwiających utrzymanie odpowiedniej ilości pojemników testowych.

Należy aklimatyzować nową hodowlę rzęsy do otoczenia testowego co najmniej przez 2 tygodnie przed rozpoczęciem badań. Ta hodowla rośnie energicznie i zapewnia prawie niewyczerpany zapas dla testów prowadzonych w odpowiednich warunkach. Hodowla uzyskana z jednej wyizolowanej rośliny powinna posłużyć do zaszczepienia wszystkich kolb użytych w opisywanym teście.

Aby przygotować 10 dm³ roztworu do hodowli, należy dodać 100 cm³ każdego roztworu podstawowego składników pokarmowych A, B i C (tabela 1) do demineralizowanej lub innej odpowiedniej wody (np. wody destylowanej). Dodać rozcieńczony (1/4 mocy) roztwór do hodowli raz w tygodniu. Głębokość wody powinna wynosić co najmniej 40 mm.

Raz w miesiącu przenieść zapasową hodowlę do świeżo przygotowanego roztworu składników odżywczych.

2.3.2. Uzyskiwanie i przygotowanie organizmów do testów

Szczepy hodowlane powinny być rozmnażane w akwariach przez okres dwóch tygodni (z koniecznym przerzedzaniem) przed użyciem w teście. Rośliny użyte w teście powinny być okresowo selekcyjonowane z akwariów hodowlanych. Zaszczepienie powinno być wykonane roślinami pochodzącymi z hodowli młodszych niż dwutygodniowe.

2.3.3. Selekcja organizmów do testów

Wybrać okazy rzęsy z hodowli, które rosły w tych samych warunkach. Uciąć wszystkie korzenie, by zredukować skażenie glonami, jeśli jest taka konieczność. Należy posegregować roślinki o podobnej wielkości, a liczba roślinek i listków powinna być taka sama lub możliwie taka sama w każdym naczyniu. Używać jedynie zdrowych roślin zawierających dwa liście o takich samych lub podobnych rozmiarach. Alternatywnie 4 rośliny 3-listne lub 3 rośliny 4-listne. Zalecane jest, by w każdym naczyniu znalazło się co najmniej 12, ale nie więcej niż 16 listków. Roślinki są ekspozowane w zamkniętych naczyniach na równe objętości każdego rozcieńczenia badanej próbki na okres 7 dni.

2.3.4. Choroby i drapieżniki

Choroby, roślinożerne owady lub inne szkodniki zwykle nie sprawiają problemów w hodowlach rzęsy. Jeżeli w hodowli wystąpią jakiegokolwiek zmiany chorobowe, należy ją zniszczyć i rozpocząć nową. Wskazane jest utrzymywanie kilku hodowli izolowanych od siebie.

2.3.5. Woda do hodowli (pożywka) i do przygotowania roztworów potrzebnych do analizy

Woda do rozcieńczeń i woda do prób kontrolnych jest identyczna z roztworem substancji odżywczych do hodowli rzęsy. Ten roztwór należy przygotować według tabel nr 1 i nr 2.

Tabela nr 1

Odczynnik	Stężenie
Roztwór A	
NaNO ₃	25,5 g/dm ³
NaHCO ₃	15,0 g/dm ³
K ₂ HPO ₄	1,04 g/dm ³
Roztwór B	
CaCl ₂ *2H ₂ O	4,41 g/dm ³
MgCl ₂	5,7 g/dm ³
FeCl ₃	0,096 g/dm ³
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0,3 g/dm ³
MnCl ₂	0,264 g/dm ³
Roztwór C	
MgSO ₄ *7H ₂ O	14,7 g/dm ³
H ₃ BO ₃	0,186 g/dm ³
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	7,26 mg/dm ³
ZnCl ₂	3,27 mg/dm ³
CoCl ₂	0,78 mg/dm ³
CuCl ₂	0,009 mg/dm ³

Tabela nr 2

Pierwiastek	Stężenie końcowe
Roztwór A	
N	42,0 mg/dm ³
Na	110,0 mg/dm ³
C	21,4 mg/dm ³
K	4,69 mg/dm ³
P	1,86 mg/dm ³
Roztwór B	
Ca	12,0 mg/dm ³
Mg	29,0 mg/dm ³
Fe	0,33 mg/dm ³
Mn	1,15 mg/dm ³
Roztwór C	
S	19,1 mg/dm ³
B	325 µg/dm ³
Mo	28,8 µg/dm ³
Zn	15,7 µg/dm ³
Co	3,54 µg/dm ³
Cu	0,04 µg/dm ³

Uwagi:

Do przygotowania pożywki dodać 1 cm³ każdego roztworu do 100 cm³ dejonizowanej wody. Ustalić pH na poziomie 7,5-8,0.

Aby przygotować 10 dm³ roztworu do hodowli, dodać 100 cm³ każdego roztworu podstawowego składników pokarmowych A, B i C (tabela nr 1) do demineralizowanej lub innej odpowiedniej wody (np. wody destylowanej).

Pożywka powinna zostać zrobiona przed każdym transferem kultur rzęsy i do przygotowania nowych roztworów podczas prowadzenia testów. Jeżeli jest przygotowywana z wyprzedzeniem, powinna być trzymana w lodówce.

2.3.6. Oświetlenie

Należy zapewnić stałe chłodne, białe jarzeniowe światło (2.150-4.300 luksów) na powierzchni wody. Natężenie światła powinno być mierzone w całym obszarze inkubacji i nie powinno się różnić więcej niż 15 % od wybranego natężenia światła.

2.3.7. Temperatura

Hodowlę należy prowadzić w pomieszczeniu o czystym powietrzu, w którym utrzymywana będzie temperatura 25±2 °C.

2.3.8. Naczynia do hodowli

Należy hodować rzęsę w 15 l naczyniu, np. akwarium lub nierdzewnej stalowej misce:

- po założeniu hodowli należy każde naczynie czyścić czystą gąbką w celu usunięcia martwej rzęsy i płukać destylowaną lub demineralizowaną wodą,
- raz w miesiącu, podczas wymiany wody, należy umyć każde naczynie wodnym roztworem detergentu; po umyciu dokładnie wypłukać 3 razy wodą wodociągową, a następnie wodą do hodowli w celu usunięcia resztek detergentu,
- czy lub inne narzędzie używane do przenoszenia rzęsy powinny zostać usunięte po użyciu lub starannie umyte i wysterylizowane przed ponownym użyciem.

3. Metodyka wykonania testu**3.1. Wytyczne ogólne**

W testach przesiewowych należy użyć ustalonych z góry rozcieńczeń do ustalenia, czy próbka jest toksyczna w porównaniu z roztworem kontrolnym; jeżeli próbka jest toksyczna, należy wykonać test wstępny, który ma na celu ustalenie rzędu toksyczności badanych wyciągów wodnych odpadów.

Naczynia używane w testach to 250 cm³ szklane zlewki lub kolbki Erlenmeyera, dość duże, by zmieścić 150 cm³ roztworu testowego i kolonie rzęsy, bez stłoczenia w czasie trwania testu; wszystkie naczynia powinny być tego samego typu i wielkości; pomimo że wykonuje się co najmniej 3 powtórzenia, czasami mogą być konieczne większe naczynia, by pomieścić dodatkowe kolonie i objętości badanych roztworów; stosunek objętości badanego roztworu do objętości naczynia nie powinien przekroczyć 2:5; dla każdego badanego rozcieńczenia i kontroli należy wykonać tyle samo powtórzeń.

Warunki środowiskowe powinny odpowiadać tym, jakie panują podczas hodowli organizmów testowych (ust. 2).

3.2. Test wstępny

Test ten powinien być przeprowadzany w celu ustalenia, czy test ostateczny jest potrzebny, i po to, aby określić rozcieńczenie roztworów dla testu ostatecznego. W testach ustalania rzędu toksyczności wykonuje się próby wstępne, sporządzając szereg rozcieńczeń badanych wyciągów wodnych z zastosowaniem ilorazu postępu geometrycznego równego 10, np. 10 %, 1 %, 0,1 %.

Jeżeli test wstępny pokazał, że najniższe rozcieńczenie wyciągu wodnego z badanej próbki odpadu nie wpłynęło niekorzystnie na rzesę, oznacza to, że wyciąg wodny badanego odpadu nie jest fitotoksyczny.

3.3. Test właściwy

Celem tego testu jest określenie NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID, S_{20} dla wzrostu rzęsy, bazując na określeniu całkowitej liczby listków, tempie wzrostu i/lub śmiertelności listków.

3.3.1. Metodyka wykonania testu:

a) do testu należy przygotować, na bazie uzyskanych wyników z testu wstępnego, 5 rozcieńczeń próbki wyciągu wodnego (nie licząc kontroli) o malejącym rozcieńczeniu, przy zastosowaniu ilorazu postępu geometrycznego rozcieńczeń od 0,5 do 2,0, np. 10 %, 5 %, 2,5 %:

- zakres rozcieńczeń badanego wyciągu powinien być dobrany tak, aby w najmniejszym rozcieńczeniu miało to wpływ na co najmniej 90 % listków rzęsy wodnej, a w najwyższym na nie więcej niż 5 % listków, w porównaniu z kontrolami,

- zakres rozcieńczeń powinien zostać dobrany tak, aby można było wykreślić krzywą odpowiedzi na rozcieńczenia, pomiędzy NER_5 a NER_{90} ,

b) dla każdego rozcieńczenia i kontroli powinny być wykonane co najmniej 3 powtórzenia, każde zawierające 150 cm³ badanego roztworu lub tyle, by wystarczyło do uzyskania wyniku przy stosunku wielkości naczyń 2:5; można zastosować mniej powtórzeń zawierających większą liczbę kolonii, ale pojemniki testowe i objętości roztworów muszą zostać odpowiednio przystosowane,

c) wprowadzić kontrolę negatywną zawierającą jedynie roztwór substancji pokarmowych lub zmodyfikowany roztwór,

d) pożywka i badane roztwory czasem muszą być wymieniane w 3. lub 5. dniu prowadzenia testu lub jeśli zaistnieje taka potrzeba częściej, by zapobiec brakom substancji odżywczych lub wyczerpaniu badanej substancji chemicznej; okresowe odnowienie pomoże zachować stałe ekspozycyjne stężenia badanej substancji przez czas trwania testu dla składników, które są niestabilne w wodzie.

3.3.2. Wyniki testu:

a) najpowszechniej używaną i pozornie wiarygodną metodą oceniania jest wzrost listków; aby zmierzyć wzrost listków, należy policzyć każdy dostrzegalny sterczący pączek, podczas oglądania pod ręcznym obiektywem lub sekcyjnym mikroskopem; ta nieniszcząca metoda zezwala na powtarzanie obserwacji tego samego roztworu; obserwacje wyglądu i liczby listków należy wykonywać w dniach 0., 3., 5. i 7.; w dniu 7. określana jest całkowita liczba żywych i/lub martwych listków; mikroskop sekcyjny ułatwi obserwacje; należy wykreślić krzywe odpowiedzi na stężenia; krzywe odpowiedzi na stężenie są kreślone dla całkowitej liczby listków, tempa wzrostu (jako liczba listków na dzień) i śmiertelności (procent martwych listków); te krzywe mogą stanowić podstawę do określania NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID, S_{20} ; należy zapisać jakiekolwiek zmiany w rozwoju lub wyglądzie listków, takie jak:

- wzrost ich ilości (listek jest liczony bez względu na rozmiar)
- zmniejszenie się rozmiaru
- chlorozę (utrata pigmentu/żółknięcie)
- nekrozy (martwe miejsca)
- zniszczenie korzenia
- utratę pływalności
- wypukłości (w kształcie łuku lub opuchlizna)
- tonięcie listków
- rozpad kolonii

porównanie chorych listków z okazami w próbie kontrolnej posłuży do ustalenia LID (rozcieńczenia niewywołującego zauważalnego efektu),

b) inne metody, które mogą być oszacowane w tym teście i które wskazałyby na inhibicję wzrostu:

- pobór węgla C₁₄
- zawartość chlorofilu a, b, c
- zawartość biomasy
- powierzchnia listków
- liczba kolonii, liczba korzeni
- długość korzeni,

c) powinny być też zapisane każde dodatkowe obserwacje, takie jak sedymentacja roztworu testowego lub inne anomalie,

d) niektóre substancje zawarte w wyciągu wodnym raczej stymulują, niż inhibują wzrost rzęsy; zanotować taki efekt, jeżeli występuje.

4. Obliczenie wyników oznaczenia

4.1. W testach przesiewowych kluczowym pytaniem jest, czy próbka jest toksyczna, czy stymulująca w porównaniu z próbą kontrolną.

4.2. Toksyczność (lub stymulację) należy określić jako procent inhibicji (lub stymulacji) w odniesieniu do kontroli:

$$\% I = 100 \times (L_k - L_t) / L_k, \text{ gdzie:}$$

L_k i L_t są średnimi długościami korzeni odpowiednio w kontroli i próbie testowej; otrzymane wyniki służą do obliczenia NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID.

4.3. Wyniki badań rozstrzygających mogą być zobrazowane przy użyciu liniowych, półlogarytmicznych lub logarytmicznych wykresów. Typowa relacja rozcieńczenie-efekt jest esowata.

4.4. Należy określić NER_5 , NER_{50} , NER_{90} , LID oraz wartość S_{20} (rozcieńczenie powodujące 20 % efekt stymulacji) za pomocą metody statystycznej lub graficznej; nachylenie zależności rozcieńczenie-reakcja jest specyficzne dla danego odpadu i dlatego może być cenną informacją.

5. Kontrola jakości

Negatywna próbka kontrolna jest konieczna do kontroli jakości. Test jest nie do zaakceptowania, jeżeli więcej niż 10 % kontrolnych osobników umrze lub okaże niekorzystne symptomy. W normalnych warunkach czas podwojenia się dla rzęsy wynosi mniej niż 2 doby. Jeżeli próbka kontrolna wykazuje mniej niż dwukrotny wzrost listków w 96 godzin, test jest nie do przyjęcia.

Załącznik nr 3

STĘŻENIA SKŁADNIKÓW

Lp.	Substancje	Stężenie, dla którego uznaje się, że odpad nie posiada składników
1	Jedna lub więcej substancji wysoce toksycznych ¹⁾	łączne stężenia - poniżej 0,1 %
2	Jedna lub więcej substancji toksycznych ¹⁾	łączne stężenia - poniżej 3 %
3	Jedna lub więcej substancji szkodliwych ¹⁾	łączne stężenia - poniżej 25 %
4	Jedna lub więcej substancji żrących określonych jako R35 ¹⁾	łączne stężenia - poniżej 1 %
5	Jedna lub więcej substancji żrących określonych jako R34 ¹⁾	łączne stężenia - poniżej 5 %
6	Jedna lub więcej substancji drażniących określonych jako R41 ¹⁾	łączne stężenia - poniżej 10 %
7	Jedna lub więcej substancji drażniących określonych jako R36, R37 i R38 ¹⁾	łączne stężenia - poniżej 20 %
8	Jedna substancja rakotwórcza kategorii 1 lub 2 ¹⁾	stężenie - poniżej 0,1 %
9	Jedna substancja rakotwórcza kategorii 3 ¹⁾	stężenie - poniżej 1 %
10	Jedna substancja szkodliwa na rozrodczość kategorii 1 lub 2 określona jako R60, R61 ¹⁾	stężenie - poniżej 0,5 %
11	Jedna substancja szkodliwa na rozrodczość kategorii 3 określona jako R62, R63 ¹⁾	stężenie - poniżej 5 %
12	Jedna substancja mutagenna kategorii 1 lub 2 określona jako R46 ¹⁾	stężenie - poniżej 0,1 %
13	Jedna substancja mutagenna kategorii 3 określona jako R40 ¹⁾	stężenie - poniżej 1 %

Objaśnienie:

¹⁾ Określone na podstawie rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie wykazu substancji niebezpiecznych wraz z ich klasyfikacją i oznakowaniem (Dz. U. Nr 199, poz. 1948) oraz rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie kryteriów i sposobu klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych (Dz. U. Nr 171, poz. 1666).