

## II

(Незаконодателни актове)

## РЕГЛАМЕНТИ

## РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 260/2014 НА КОМИСИЯТА

от 24 януари 2014 година

за изменение, с цел адаптиране към техническия прогрес, на Регламент (ЕО) № 440/2008 за определяне на методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH)

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (ЕО) № 793/93 на Съвета и Регламент (ЕО) № 1488/94 на Комисията, както и на Директива 76/769/ЕО на Съвета и директиви 91/155/ЕО, 93/67/ЕО, 93/105/ЕО и 2000/21/ЕО на Комисията<sup>(1)</sup>, и по-специално член 13, параграф 3 от него,

като има предвид, че:

- (1) Регламент (ЕО) № 440/2008 на Комисията<sup>(2)</sup> съдържа методите за изпитване с цел определяне на физичните и химичните свойства, токсичността и екотоксичността на вещества, които се използват за целите на Регламент (ЕО) № 1907/2006.
- (2) Необходимо е да се актуализира Регламент (ЕО) № 440/2008, за да се включат приоритетно нови и актуализирани алтернативни методи за изпитване, наскоро приети от Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (ОИСР), с цел да се постигне намаление на броя на използваните за опитни цели животни, в съответствие с Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни

цели<sup>(3)</sup> и Директива 86/609/ЕО на Съвета от 24 ноември 1986 г. за сближаване на законовите, подзаконовите и административните разпоредби на държавите-членки относно защитата на животните, използвани за опитни и други научни цели<sup>(4)</sup>.

- (3) Адаптирането съдържа два метода за определяне на физичните и химичните свойства, включително актуализация на метода за изпитване на разтворимостта, както и нов метод за изпитване на коефициента на разпределение, който е от значение за оценката на устойчиви, биоакмулиращи и токсични вещества (РВТ); четири нови и един актуализиран метод за определяне на екотоксичност и съдба и поведение в околната среда; девет метода за определяне на токсичност и други видове въздействие върху здравето, включително методи за изпитване на инхалаторна токсичност, които съдържат актуализация на три метода и един нов метод за намаляване на броя на използваните животни и за подобряване на оценката на въздействието, актуализация на метода за 28-дневно изпитване на оралната токсичност с повтаряща се доза, в който бяха включени параметри за оценка на ендокринната активност, актуализация на метода за изпитване на токсикокинетиката, който е от значение за планирането и разбирането на токсикологичните изследвания, и актуализация на методите за изпитване на хронично, канцерогенно и комбинирано хронично и канцерогенно въздействие.
- (4) Поради това Регламент (ЕО) № 440/2008 следва да бъде съответно изменен.
- (5) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на комитета, учреден съгласно член 133 от Регламент (ЕО) № 1907/2006,

(1) ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1.

(2) ОВ L 142, 31.5.2008 г., стр. 1.

(3) ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33.

(4) ОВ L 358, 18.12.1986 г., стр. 1.

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

*Член 1*

Приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 се изменя в съответствие с приложението към настоящия регламент.

*Член 2*

Настоящият регламент влиза в сила на третия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави членки.

Съставено в Брюксел на 24 януари 2014 година.

*За Комисията*  
*Председател*  
José Manuel BARROSO

---

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 се изменя, както следва:

1) Глава А.6 се заменя със следното:

**„А.6. РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА****УВОД**

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 105 на ОИСП (ОИСП TG 105) (1995 г.). Настоящият метод за изпитване е преработена версия на оригиналното ОИСП TG 105 (1995 г.). Няма съществена разлика между настоящата версия и версията от 1981 г. Променен е главно форматът. Преразглеждането е извършено въз основа на метод на ЕС за изпитване „Разтворимост във вода“<sup>(1)</sup>.

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

2. Разтворимостта във вода на дадено вещество може значително да се повлияе от наличието на примеси. Настоящият метод за изпитване е насочен към определяне на разтворимостта във вода на чисти вещества, които са стабилни във вода и не са летливи. Преди да се определи разтворимостта във вода е полезно да съществува налична предварителна информация за изпитваното вещество, като например структурна формула, парно налягане, дисоциационна константа и хидролиза като функция на рН.
3. В настоящия метод за изпитване са описани два метода — методът на елуиране от колона и методът на стъклената, които обхващат съответно разтворимости под и над  $10^{-2}$  g/l. Описано е също и просто предварително изпитване. То позволява приблизителното определяне на подходящото количество на пробата, което да бъде използвано при окончателното изпитване, както и времето, необходимо за постигането на насищане.

**ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ**

4. Разтворимостта във вода на дадено вещество се определя като масовата концентрация на наситения разтвор на веществото във вода при дадена температура.
5. Разтворимостта във вода се изразява в маса на разтвореното вещество за обем разтвор. Мерната единица в системата SI е  $\text{kg/m}^3$ , но може също да се използва и g/l.

**СРАВНИТЕЛНИ ХИМИКАЛИ**

6. Не е необходимо да се използват сравнителни химикали при изследване на изпитвано вещество.

**ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ****Условия на изпитването**

7. За предпочитане е изпитването да се провежда при  $20 \pm 0,5$  °C. Избраната температура трябва да се поддържа постоянна във всички относими части на оборудването.

**Предварително изпитване**

8. Чрез прилагане на поетапна процедура се добавят нарастващи обеми вода при стайна температура към приблизително 0,1 g от пробата (твърдите изпитвани вещества трябва да се привеждат в прахообразно състояние) в мерителен цилиндър със стъклена запушалка с вместимост 10 ml. След всяко прибавяне на дадено количество вода сместа се разклаща в продължение на 10 минути и визуално се проверява за наличието на неразтворени частици от пробата. Ако след прибавянето на 10 ml вода пробата или частици от нея останат неразтворени, опитът се продължава в мерителен цилиндър с вместимост 100 ml. Приблизителната разтворимост е дадена в таблица 1 по-долу под онзи обем вода, при който настъпва пълното разтваряне на пробата. Когато разтворимостта е малка може да е необходимо продължително време за разтваряне на дадено изпитвано вещество и следва да бъдат предоставени най-малко 24 часа. Ако след 24 часа изпитваното вещество е още не е разтворено следва да се предостави повече време (до 96 часа) или да се направи опит за по-нататъшно разреждане с цел да се установи дали следва да се използва методът на елуиране от колона или методът на стъклената.

Таблица 1

ml вода за 0,1 g разтворими	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Приблизителна разтворимост в g/l	> 1 000	1 000 до 200	200 до 100	100 до 50	50 до 10	10 до 1	< 1

### Метод на елуиране от колона

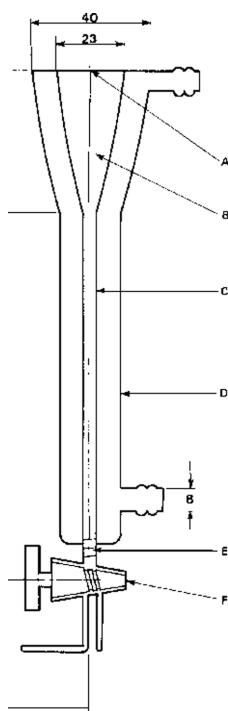
#### Принцип

9. Настоящият метод се основава на елуиране на изпитваното вещество с вода от микроколони, запълнена с инертен носител, предварително покрит с излишък от изпитваното вещество (2). Разтворимостта във вода се определя като масовата концентрация на елуата когато кривата на същата е достигнала плато като функция от времето.

#### Апаратура

10. Апаратът се състои от микроколони (фигура 1), поддържана при постоянна температура. Тя е свързана или с рециркуляционна помпа (фигура 2), или с нивелиращ съд (фигура 3). Микроколоната съдържа инертен носител, закрепен на място с малка запушалка от стъклена вата, която служи и за филтруване на твърдите частици. Материалите, които могат да се използват като носители, са стъклени перли, диатомит или други инертни материали.
11. Микроколоната, показана на фигура 1, е подходяща за постановката с рециркуляционна помпа. Тя има входно разширение, достатъчно за пет обема на колоната (които се изхвърлят в началото на опита) и обема на пет проби (за анализ по време на опита). Като алтернатива, размерът може да бъде намален, ако към системата може да бъде добавяна вода по време на опита, за да замести първоначалните пет обема, отстранени с примесите. Колоната се свързва, посредством направена от инертен материал тръбичка, с рециркуляционната помпа, с която могат да се подават приблизително 25 ml/h. Рециркуляционната помпа може да бъде например перисталтична или мембранна помпа. Трябва да се вземат мерки да не се допусне замърсяване и/или адсорбция на веществото от материала, от който е направена тръбичката.
12. Схематично подреждане при използване на нивелиращ съд е показано на фигура 3. При това подреждане микроколоната е оборудвана с еднопосочен спирателен кран. Връзката към нивелиращия съд се състои от шарнир от шлифовано стъкло и тръбичка, направена от инертен материал. Обемната скорост на потока от нивелиращия съд следва да бъде приблизително 25 ml/h.

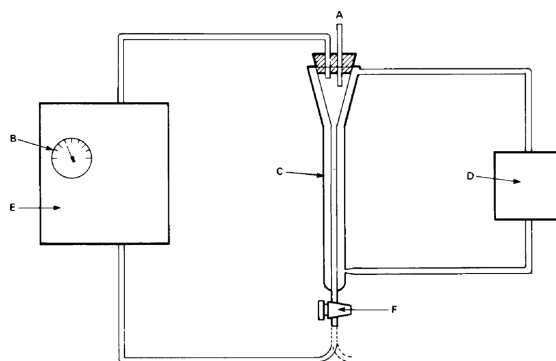
Фигура 1



Размерите са в mm

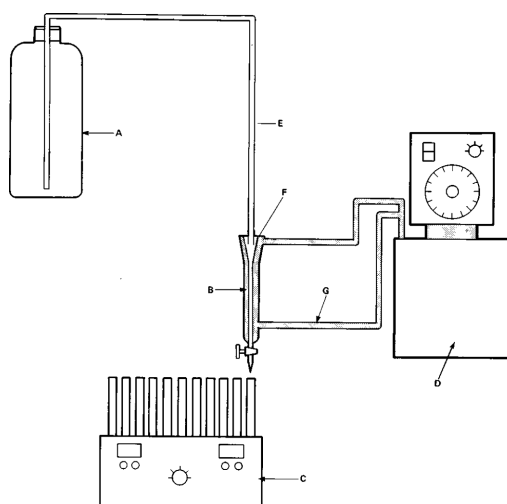
- A. Връзка за шарнир от шлифовано стъкло
- B. Входно разширение
- C. Вътрешна част 5
- D. Външна част 19
- E. Тапа от стъклена вата
- F. Спирателен кран

Фигура 2



- A. Атмосферно уравнивяване
- B. Дебитометър
- C. Микроколна
- D. Термостатирана циркуляционна помпа
- E. Рециркуляционна помпа
- F. Двупосочен кран за отбиране на проби

Фигура 3



- A. Нивелиращ съд (например колба с обем 2,5 литра)
- B. Колна
- C. Колектор за фракциите
- D. Термостат
- E. Тефлонови тръбички
- F. Шарнир от шлифовано стъкло
- G. Водна линия (между термостата и колоната, вътрешен диаметър приблизително 8 mm)

13. Приблизително 600 mg от носителя се прехвърлят в облоцънна колба от 50 ml. Подходящо количество от изпитваното вещество се разтваря в летлив разтворител с квалификация „чист за анализ“ и подходяща част от този разтвор се прибавя към носителя. Разтворителят се изпарява напълно, например с ротационен изпарител, тъй като в противен случай, поради разпределението на повърхността, няма да може да бъде постигнато насищане с вода на носителя през етапа на елуирането. Наточареният с веществото носител се оставя да се просмуче в продължение на два часа в около 5 ml вода, след което суспензията се поставя в микроколоната. Като алтернатива, сушият носител, наточарен с веществото, може да се насие в напълнената с вода микроколна, като се дават два часа за уравнивяване.

14. Натоварването на носителя може да създаде проблеми, водещи до погрешни резултати, например когато изпитваното вещество се отлага под формата на масло. Тези проблеми трябва да бъдат изследвани опитно и подробностите трябва да бъдат докладвани.

*Процедура с използване на рециркуляционна помпа*

15. Потокът през колоната се стартира. Препоръчително е да се използва обемна скорост на потока от приблизително 25 ml/h, съответстваща на 10 обема на описаната тук колона за час. Първите най-малко пет колонни обема се изхвърлят, за да се отстранят разтворимите във вода примеси. След това помпата се оставя да работи, докато се установи равновесие, като настъпването на равновесието се определя от пет последователни проби, чиито концентрации, взети в произволен ред, не трябва да се различават една от друга с повече от  $\pm 30\%$ . Отбирането на тези проби трябва да бъде разделено от времеви интервали, съответстващи най-малко на времето, необходимо за преминаването на 10 колонни обема. В зависимост от използвания метод за анализ, може да е препоръчително да се установи крива концентрация/време, за да се покаже, че равновесието е достигнато.

*Процедура с използване на нивелиращ съд*

16. Последователни фракции от елуата се събират и анализират по избрания метод. Фракциите от средата на интервала за елуиране, където концентрациите са постоянни в рамките на  $\pm 30\%$  при най-малко пет последователни фракции, се използват за определяне на разтворимостта.
17. Предпочитаният елуент е бидестилирана вода. Може да се използва също и дейонизирана вода със специфично съпротивление над 10 Mohm.cm и общо съдържание на органичен въглерод под 0,01 %.
18. По двете процедури се извършва втори опит, при който обемната скорост на потока е равна на половината от обемната скорост при първия опит. Ако резултатите от двата опита са близки, изпитването се счита за успешно. Ако при по-малка обемна скорост на потока се получи по-голяма разтворимост, намаляването на обемната скорост на потока наполовина продължава, докато при два последователни опита се получи една и съща разтворимост.
19. По двете процедури фракциите трябва да се проверяват за наличието на колоидни частици чрез изследване за Тиндалов ефект. Наличието на такива частици прави изпитването невалидно и изпитването трябва да се повтори, след като се подобри филтруването от колоната.
20. pH на всяка проба трябва да се измери, за предпочитане чрез използване на специални индикаторни ленти.

**Метод на стъкленницата**

*Принцип*

21. Изпитваното вещество (твърдите вещества трябва да се привеждат в прахообразно състояние) се разтваря във вода при температура, малко по-висока от температурата на изпитването. Когато се достигне насищането, сместа се охлажда и се държи при температурата на изпитването. Като алтернатива, измерването може да се проведе и направо при температурата на изпитването, ако с помощта на подходящи проби се докаже, че е достигнато равновесие на насищане. След това с подходящ метод за анализ се определя масовата концентрация на изпитваното вещество във водния разтвор, който не бива да съдържа неразтворени частици (3).

*Апаратура*

22. Необходими са следните материали:
- обичайните лабораторни прибори и стъклария,
  - уред за разбъркване на разтворите при контролирана постоянна температура,
  - центрофуга, ако се изисква за емулсии (за предпочитане термостатирана), и
  - аналитично оборудване.

*Процедура*

23. Прогнозното количество изпитвано вещество, необходимо за достигане на насищане на желанния обем вода, се определя при предварителното изпитване. Около пет пъти от това количество се претеглят и се поставят поотделно в три стъклени съда, снабдени със стъклени запушалки (например центрофужни епруветки, колби). Даден обем вода, определен в зависимост от метода за анализ и диапазона на разтворимостта, се добавя към всеки съд. След това съдовете се затварят плътно и се разклащат при температура 30 °C. Следва да се използват клатачни машини или бъркалки, които могат да работят при постоянна температура, например магнитна бъркалка в термостатирана водна баня. След един ден се извършва уравновесяване на един от съдовете в продължение на 24 часа при температурата на изпитването, като същият периодично се разклаща. След това съдържанието на съда се центрофузира при температурата на изпитването и концентрацията на изпитваното вещество в бистрата водна

фаза се определя с подходящ метод за анализ. Другите две стъкленици се обработват по подобен начин след първоначално уравнисяване при 30 °C в продължение съответно на два и три дни. Ако концентрациите, измерени най-малко в двата последни съда, не се различават с повече от 15 %, изпитването се счита за задоволително. Ако резултатите от съдове 1, 2 и 3 показват тенденция към нарастване на получените стойности за разтворимостта, цялото изпитване трябва да се повтори при по-продължителни периоди за уравнисяване.

24. Изпитването може да се извърши също без предварителна инкубация при 30 °C. За да се определи скоростта, с която се установява равновесието на насищане, се вземат проби до преустановяване на влиянието на времето на разбъркване върху измерената концентрация.
25. pH на всяка проба трябва да се измери, за предпочитане чрез използване на специални индикаторни ленти.

#### **Аналитични определения**

26. Предпочита се специфичен за дадено вещество метод за анализ, тъй като малки количества от разтворими примеси могат да доведат до големи грешки в измерената величина на разтворимостта. Примери за такива методи са: газова или течна хроматография, титриметрия, фотометрия, волтаперометрия.

#### **ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ**

##### **Данни**

*Метод на елуиране от колона*

27. За всеки опит следва да бъдат изчислени средната стойност и стандартното отклонение от най-малко пет последователни проби, взети в платото на насищане. Средните стойности, получени при две изпитвания с различни потоци, не следва да се различават с повече от 30 %.

*Метод на стъкленицата*

28. Индивидуалните резултати за всеки от трите съда, които не трябва да се различават с повече от 15 %, се усредняват.

#### **Доклад от изпитването**

*Метод на елуиране от колона*

29. Докладът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

- резултатите от предварителното изпитване,
- идентичността на химикала и примесите (етап на предварително пречистване, ако има такъв),
- концентрациите, обемните скорости на потока и pH за всяка проба,
- средните стойности и стандартните отклонения на най-малко пет проби от платото на насищане при всеки опит,
- средната стойност от най-малко два последователни опита,
- температурата на водата по време на процеса на насищане,
- методът на анализ,
- природата на носителя,
- натоварването на носителя,
- използваният разтворител,
- данните за евентуална химична неустойчивост на веществото в процеса на изпитването,
- всякаква информация, относима към интерпретирането на резултатите, особено по отношение на примесите и агрегатното състояние на веществото.

*Метод на стъкленицата*

30. Докладът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

- резултатите от предварителното изпитване,
- идентичността на химикала и примесите (етап на предварително пречистване, ако има такъв),

- резултатите от индивидуалните методи за анализ, както и средната стойност в случаите, когато за всеки съд е получена повече от една стойност,
- рН на всяка проба,
- средната стойност от резултатите за различни съдове, които са били близки,
- температурата на изпитването,
- методът за анализ,
- данните за всякаква химична неустойчивост на веществото в процеса на изпитването,
- всякаква информация, относима към интерпретирането на резултатите, особено по отношение на примесите и агрегатното състояние на изпитваното вещество.

#### ПРЕПРАТКИ:

- (1) Директива 92/69/ЕИО на Комисията от 31 юли 1992 година относно седемнадесетото адаптиране към техническия прогрес на Директива 67/548/ЕИО на Съвета за сближаването на законовите, подзаконовите и административните разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетирването на опасни вещества, ОВ L 383, 29.12.1992 г., стр. 113.
  - (2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use -Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility - Column elution method
  - (3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use - Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility - Flask method“
- 2) Добавя се следната глава A.23:

#### „A.23. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ (1-ОКТАНОЛ/ВОДА): МЕТОД НА БАВНО РАЗБЪРКВАНЕ

##### УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 123 на ОИСП (ОИСП TG 123) (2006 г.). Коефициентът на разпределение 1-октанол/вода ( $P_{OW}$ ) със стойности до  $\log P_{OW} 8,2$  се определя точно чрез метода на бавно разбъркване (1). Поради това този експериментален подход е подходящ за директно определяне на  $P_{OW}$  на силно хидрофобни вещества.
2. Други методи за определяне на коефициента на разпределение 1-октанол/вода ( $P_{OW}$ ) са методът „разклащане в стъкленница“ (2) и определянето на  $P_{OW}$  от поведението на задържане при HPLC с обърната фаза (3). При метода „разклащане в стъкленница“ са възможни артефакти поради преноса на микрокапчици октанол във водната фаза. С повишаването на стойностите на  $P_{OW}$  наличието на тези капчици във водната фаза води до растящо завишаване на оценката за концентрацията на изпитваното вещество във водата. Поради това, използването на този метод се ограничава само до вещества с  $\log P_{OW} < 4$ . Вторият метод разчита на сигурни данни от пряко определени стойности на  $P_{OW}$  за калибриране на връзката между поведението на задържане при HPLC и измерените стойности на  $P_{OW}$ . Налични са били проектоуказания на ОИСП за определяне на коефициентите на разпределение 1-октанол/вода на вещества, които могат да съществуват в йонизирано състояние (4), но използването на същите се преустановява.
3. Настоящият метод за изпитване е разработен в Нидерландия. Точността на методите, описани тук, е била валидирана и оптимизирана с изследване за валидиране чрез кръгово изпитване, в което са взели участие 15 лаборатории (5).

##### ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

##### Значение и употреба

4. За инертни органични вещества е открита значителна взаимовръзка между коефициентите на разпределение 1-октанол/вода ( $P_{OW}$ ) и тяхната биоаккумуляция в рибата. Освен това е доказано, че  $P_{OW}$  е свързан и с токсичността на рибата, както и със сорбцията на химикали в твърди вещества като почви и седименти. В препратка 6 е представен подробен преглед на взаимовръзките.



5. Установени са множество взаимовръзки между коефициента на разпределение 1-октанол/вода и други свойства на вещества от значение за екологичната токсикология и химията. Вследствие на това, коефициентът на разпределение 1-октанол/вода се превърна в ключов параметър при оценката на екологичния риск от химикали, както и за прогнозиране на поведението на химикалите в околната среда.

#### Обхват

6. Смята се, че опитът с бавно разбъркване намалява образуването на микрокапчици от капчици от 1-октанол във водната фаза. Вследствие на това не се получава завишена оценка на концентрацията във вода заради молекулите на изпитваното вещество, свързани с такива капчици. Поради това методът на бавно разбъркване е особено подходящ за определянето на  $P_{OW}$  за вещества с очаквани стойности на  $\log P_{OW}$  5 и по-високи, за които методът „разклашане в стъкленница“ (2) би могъл да доведе до погрешни резултати.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

7. Коефициентът на разпределение на едно вещество между вода и липофилен разтворител (1-октанол) характеризира равновесното разпределение на химикала между двете фази. Коефициентът на разпределение между вода и 1-октанол ( $P_{OW}$ ) се определя като съотношението на равновесните концентрации на изпитваното вещество в 1-октанол, наситен с вода ( $C_O$ ) и във вода, наситена с 1-октанол ( $C_W$ ).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Понеже е съотношение на концентрации, той е безразмерна величина. Най-често той се представя като десетичен логаритъм ( $\log P_{OW}$ ).  $P_{OW}$  зависи от температурата и в докладваните данни следва да се включи температурата при измерването.

#### ПРИНЦИП НА МЕТОДА

8. За да се определи коефициентът на разпределение, водата, 1-октанолът и изпитваното вещество се урівновесяват едно с друго при постоянна температура. След това се определят концентрациите на изпитваното вещество в двете фази.
9. Експерименталните трудности, свързани с образуването на микрокапчици по време на опита с разклашане в стъкленница, могат да бъдат намалени чрез предложени тук опит с бавно разбъркване. При опита с бавно разбъркване водата, 1-октанолът и изпитваното вещество се урівновесяват в термостатиран реакционен съд с разбъркване. Обменът между фазите се ускорява чрез разбъркване. Разбъркването предизвиква ограничена турбулентност, която засилва обмена между 1-октанола и водата, без да се образуват микрокапчици (1).

#### ПРИЛОЖИМОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

10. Тъй като наличието на вещества, различни от изпитваното вещество, може да повлияе на коефициента на активност на изпитваното вещество, същото трябва да се изследва като чисто вещество. За опита по разпределение 1-октанол/вода следва да се използват вещества с възможно най-високата предлагана на пазара чистота.
11. Настоящият метод е приложим за чисти вещества, които не са обект на дисоциация или асоциация и не показват значителна повърхностна активност на границата между двете фази. Той може да се прилага за определяне на съотношението на разпределение 1-октанол/вода за такива вещества и смеси. Когато методът се използва за смеси, определените съотношения за разпределение 1-октанол/вода са условни и зависят от химичния състав на изпитваната смес и от електролитния състав, използван като водна фаза. Методът е приложим също и за съединения, които са обект на дисоциация или асоциация, ако се предприемат допълнителни стъпки (точка 12).
12. Поради многобройните равновесия във вода и 1-октанол, включени в разпределението 1-октанол/вода на вещества, които са обект на дисоциация, като органични киселини и феноли, органични основи и органометални вещества, съотношението на разпределение 1-октанол/вода е условна константа, която зависи в голяма степен от електролитния състав (7)(8). Поради това при определянето на съотношението на разпределение 1-октанол/вода се изисква рН и електролитният състав да бъдат контролирани по време на опита и докладвани. При оценката на тези съотношения на разпределение трябва да се използва експертна преценка. С помощта на стойността на дисоциационната константа (константи) трябва да се изберат подходящи стойности на рН, така че съотношението на разпределение да се определи за всяко йонизационно състояние. При изпитване на органометални съединения трябва да се използват буфери, които не образуват комплексни съединения (8). Като се вземат предвид съществуващите знания в областта на химията на водата (стабилитетни константи, дисоциационни константи), условията на опита следва да се изберат по такъв начин, че да може да бъде направена оценка на химичния вид на изпитваното вещество във водната фаза. Йонната сила следва да бъде еднаква във всички опити, като се използва фонов електролит.
13. Могат да възникнат трудности при провеждане на изпитвания на малко разтворими във вода вещества или на такива с висок  $P_{OW}$  поради факта, че концентрациите във водата стават толкова ниски, че се затруднява точното им определяне. В настоящия метод за изпитване са предоставени указания за решаване на този проблем.

## ИНФОРМАЦИЯ ОТНОСНО ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

14. Чистотата на химичните реагенти трябва да бъде с квалификация „чист за анализ“ или по-висока. Препоръчва се използването на небелязани изпитвани вещества с известен химичен състав и за предпочитане с чистота най-малко 99 %, или на белязани изпитвани вещества с известни химичен състав и радиохимична чистота. В случай на индикатори за кратък полуживот следва да се прилагат корекции за разпадане. В случай на белязани изпитвани вещества следва да се използва метод за анализ, специфичен за съответния химикал, за да се гарантира, че измерената радиоактивност е пряко свързана с изпитваното вещество.
15. Прогнозен  $\log P_{OW}$  може да се изчисли чрез използването на наличен в търговската мрежа софтуер за определяне на  $\log P_{OW}$  или чрез използване на съотношението на разтворимостта в двата разтворителя.
16. Преди да се проведе опит с бавно разбъркване за определяне на  $P_{OW}$  следва да е налице следната информация за изпитваното вещество:
- структурна формула;
  - подходящи методи за анализ за определяне на концентрацията на веществото във вода и в 1-октанол;
  - дисоциационна константа (константи) на вещества, които могат да съществуват в йонизирано състояние (Указание 112 на ОИСП) (9);
  - разтворимост във вода (10);
  - абиотична хидролиза (11);
  - готова биоразложимост (12);
  - парно налягане (13).

## ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

**Оборудване и прибори**

17. Необходимо е стандартно лабораторно оборудване, по-специално следното:
- за разбъркване на водната фаза се използват магнитни смесители и покрити с тефлон магнитни бъркалки,
  - прибори за анализ, подходящи за определяне на концентрацията на изпитваното вещество при очакваните концентрации,
  - съд за разбъркване с изпускателен кран на дъното. В зависимост от очакваните стойности на  $\log P_{OW}$  и границата на откриване (ГО) на изпитваното съединение, трябва да се предвиди използване на реакционен съд със същата конфигурация, с вместимост над един литър, за да може да се набави достатъчно количество вода за химична екстракция и анализ. Вследствие на това във водния екстракт ще се получат по-високи концентрации, а оттам и по-надеждно аналитично определяне. В допълнение 1 е дадена таблица за изчисляване на минималния необходим обем, ГО на съединението, неговият очакван  $\log P_{OW}$  и разтворимостта му във вода. Таблицата е основана на връзката между  $\log P_{OW}$  и съотношението между разтворимостите в октанол и във вода, както е представено от Pinsuwan et al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

където

$$SR = S_{oct}/S_w(\text{в mol/l}),$$

и на връзката, посочена от Lutman (15), за прогнозиране на разтворимостта във вода. Разтворимостта във вода, изчислена чрез уравнението, дадено в допълнение 1, трябва да се счита за първоначална оценка. Следва да се отбележи, че потребителят е свободен да изчисли прогноза за разтворимостта във вода чрез всякаво отношение, за което се счита, че представя по-добре връзката между хидрофобност и разтворимост. За твърди съединения се препоръчва например включването на точка на топене при прогнозиране на разтворимостта. В случай че се използва изменено уравнение, следва да се потвърди, че уравнението за изчисляване на разтворимостта в октанол продължава да е валидно. В допълнение 2 е представен схематичен чертеж на покрит със стъкло съд за разбъркване с обем приблизително един литър. Пропорциите на съда, показан в допълнение 2, са доказани като подходящи и следва да се запазят, когато се използва апаратура с различни размери,

- от съществено значение е по време на опита с бавно разбъркване да има средство за поддържане на постоянна температура.

18. Съдовете следва да са изработени от инертен материал, така че адсорбцията от повърхността на съда да бъде пренебрежимо малка.

#### Приготвяне на разтворите за изпитване

19. Определянето на  $P_{OW}$  следва да се извършва с възможно най-чистия 1-октанол, който се предлага в търговската мрежа (най-малко +99 %). Препоръчва се пречистване на 1-октанол чрез екстракция с киселина, основа и вода и последващо изсушаване. Освен това за пречистване на 1-октанол може да се използва и дестилация. Пречистеният 1-октанол се използва за приготвяне на стандартни разтвори на изпитваните вещества. Водата, която се използва при определянето на  $P_{OW}$ , следва да бъде дестилирана в стъклен или кварцов съд, или получена от пречистваща система, или може да се използва вода с чистота „за HPLC“. За дестилираната вода е нужно филтруване през 0,22  $\mu\text{m}$  филтър и следва да се включат празни проби, за да се провери дали няма наличие на примеси, които могат да взаимодействат с изпитваното вещество в концентрираните екстракти. Ако се използва филтър от стъклена вата, той трябва да бъде почистен чрез нагриване най-малко за три часа при температура 400 °C.
20. И двата разтворителя се насищат взаимно преди опита чрез уравнивяването им в достатъчно голям съд. Това се постига чрез бавно разбъркване на двуфазовата система в продължение на два дни.
21. Избира се подходяща концентрация на изпитваното вещество и същото се разтваря в 1-октанол (наситен с вода). Коефициентът на разпределение 1-октанол/вода трябва да бъде определен в разредени разтвори в 1-октанол и вода. Поради това концентрацията на изпитваното вещество не бива да превишава 70 % от разтворимостта му с максимална концентрация от 0,1 mol/l във всяка фаза (1). Разтворите на 1-октанол, използвани в опита, не трябва да съдържат твърдо изпитвано вещество под форма на суспензия.
22. Подходящото количество изпитвано вещество се разтваря в 1-октанол (наситен с вода). Ако очакваната стойност на  $P_{OW}$  е по-висока от пет, следва да се вземат мерки разтворите на 1-октанол, използвани за опита, да не съдържат твърдо изпитвано вещество под форма на суспензия. За тази цел се използва следната процедура за химикали с очаквана стойност на  $\log P_{OW} > 5$ :

- изпитваното вещество се разтваря в 1-октанол (наситен с вода),
- разтворът се оставя за достатъчно дълъг период, докато суспендираното твърдо вещество се отдели. По време на отделянето се наблюдава концентрацията на изпитваното вещество,
- след като измерените концентрации в разтвора на 1-октанол достигнат стабилни стойности, изходният разтвор се разрежда с подходящ обем от 1-октанол,
- измерва се концентрацията на разреждения изходен разтвор. Ако измерената концентрация съответства на разреждането, разрежденият изходен разтвор може да бъде използван в опита с бавно разбъркване.

#### Екстракция и анализ на пробите

23. За анализ на изпитваното вещество следва да се използва валидиран метод за анализ. Изследващите трябва да представят доказателство, че по време на опита концентрациите във водната фаза на наситения с вода 1-октанол, както и във водната фаза на наситената с 1-октанол вода, са над границата на количествено определяне на метода за използваните аналитични процедури. Аналитичните добиви на изпитваното вещество от водната фаза и от водната фаза на 1-октанол трябва да бъдат установени преди опита в случаите, когато са необходими методи за екстракция. Аналитичният сигнал трябва да бъде коригиран за празни проби и трябва да се вземат мерки да няма нежелан пренос на аналит от една проба в друга.
24. Съществува вероятност преди анализа да се наложат екстракция на водната фаза с органичен разтворител и предварителна концентрация на екстракта поради твърде ниските концентрации на хидрофобни изпитвани вещества във водната фаза. По същата причина е необходимо да се намалят евентуални концентрации на празни проби. За тази цел е нужно да се използват разтворители с висока чистота, за предпочитане разтворители за анализ на остатъчни количества. Освен това, работата с предварително внимателно почистени стъклени съдове (напр. измити с разтвор или нагreti при висока температура) може да допринесе за избягване на кръстосано замърсяване.
25. Прогнозни стойности на  $\log P_{OW}$  могат да бъдат получени от програма за прогнози или чрез експертна оценка. Ако стойността е по-висока от шест, трябва да се наблюдават внимателно корекциите на празните проби и нежеланият пренос на аналит. По подобен начин, ако прогнозната стойност на  $\log P_{OW}$  надвишава шест, е задължително използването на репрезентативно за физичните и химичните свойства на аналита вещество (сурогат) като стандарт за коригиране на добива, за да може да бъде достигната висока кратност на предварителна концентрация. В търговската мрежа се предлагат редица софтуерни програми за прогнозиране на стойността на  $\log P_{OW}$  (1), например Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) и ACD log P (19). Описания на подходите за прогнозиране могат да бъдат намерени в източници (20—22) от препратките.

(1) Тази информация се предоставя само за удобство на потребителите. Могат да се използват други еквивалентни компютърни програми, ако се докаже, че дават същите резултати.

26. Границите на количествено определяне (ГКО) за определянето на изпитваното вещество в 1-октанол и вода се установяват чрез възприети методи. Като практическо правило, границата на количествено определяне на метода може да бъде определена като концентрацията във вода или 1-октанол, която произвежда съотношение на сигнал към шум, равно на десет. Следва да бъде избран подходящ метод за екстракция и предварителна концентрация и да бъдат определени аналитични добиви. Избира се подходяща кратност за предварителна концентрация, за да се получи сигнал с необходимия размер при аналитичното определяне.
27. Въз основа на параметрите на метода за анализ и на очакваните концентрации се определя приблизителният размер на пробата, необходим за точно определяне на концентрацията на съединението. Трябва да се избягва използването на водни проби, които са твърде малки за получаване на достатъчен аналитичен сигнал. Трябва да се избягва и използването на прекалено големи водни проби, тъй като в противен случай е възможно да остане твърде малко вода за изисквания минимален брой анализи ( $n = 5$ ). В допълнение 1 минималният обем на пробата е посочен като функция от обема на съда, ГО на изпитваното вещество и разтворимостта на изпитваното вещество.
28. Количественото определяне на изпитваните вещества става чрез сравняване с калибрационните криви на съответното съединение. След концентрациите в анализирани проби в скоби трябва да се посочат стандартните концентрации.
29. За изпитвани вещества с прогнозна стойност на  $\log P_{OW}$  по-висока от шест, във водната проба трябва да се добави стандарт от сурогат преди екстракцията, за да бъдат регистрирани загубите, настъпващи по време на екстракцията и на предварителната концентрация на водните проби. За точна корекция на добива сурогатите трябва да притежават свойства, които да са много близки до или идентични с тези на изпитваното вещество. За тази цел се предпочитат използването на (стабилни) изотопно белязани аналози на въпросните вещества (например, предварително обработени с деутерий или белязани с  $^{13}C$ ). Ако използването на белязани стабилни изотопи, т.е.  $^{13}C$  или  $^2H$ , не е възможно, надеждни данни в литературата трябва да доказват, че физичните и химичните свойства на сурогата са много близки до тези на изпитваното вещество. По време на течно-течна екстракция от водната фаза могат да се образуват емулсии. Те могат да бъдат намалени чрез добавяне на сол и оставяне на емулсията да се отдели през нощта. Методите, използвани за екстракция и предварителна концентрация на пробите, трябва да бъдат докладвани.
30. При необходимост пробите, взети от фазата на 1-октанол, могат да бъдат разреждени с подходящ разтворител преди анализа. Освен това, използването на стандарти от сурогат за корекция на добива се препоръчва за вещества, за които опитите за добива са показали висока степен на колебание (относително стандартно отклонение  $> 10\%$ ).
31. Подробната информация по метода за анализ трябва да бъде докладвана. Това включва метод на екстракция, кратност на предварителната концентрация и разреждането, параметри на инструментите, процедура за калибриране, калибрационен обхват, аналитичен добив на изпитваното вещество от вода, добавяне на стандарти от сурогат за корекция на добива, стойности на празни проби, граници на откриване и на количествено определяне.

#### **Извършване на изпитването**

##### *Оптимални обемни съотношения 1-октанол/вода*

32. При избора на водата и 1-октанола следва да бъдат разгледани ГКО в 1-октанол и вода, кратността на предварителната концентрация, прилагана към водните проби, обемите на пробите в 1-октанол и вода, и очакваните концентрации. Поради експериментални причини, обемът на 1-октанол в системата за бавно разбъркване следва да бъде избран така, че слой от 1-октанол да бъде достатъчно дебел ( $> 0,5$  cm), за да може да бъде взета проба от фазата на 1-октанол без слой да бъде нарушен.
33. Типичните фазови съотношения, използвани за определянето на съединения с  $\log P_{OW}$  4,5 и по-висок, са от 20 до 50 ml 1-октанол и от 950 до 980 ml вода в съд от един литър.

##### *Условия на изпитването*

34. По време на изпитването реакционният съд е термостатиран, за да се намалят колебанията на температурата до под  $1^\circ C$ . Анализът трябва да се извършва при температура  $25^\circ C$ .
35. Експерименталната система следва да бъде предпазена от дневна светлина, като опитът се провежда в тъмна стая или чрез покриване на реакционния съд с алуминиево фолио.
36. Опитът следва да бъде извършен в обезпращена (доколкото е възможно) среда.
37. Системата 1-октанол—вода се разбърква, докато се постигне равновесие. При пилотен опит продължителността на периода за уравнисяване се преценява чрез извършване на опит с бавно разбъркване и периодично вземане на проби от 1-октанол и вода. Времеви точки за пробовземането трябва да бъдат на интервал най-малко от пет часа.
38. Всяко определяне на  $P_{OW}$  трябва да бъде извършвано, като се направят поне три независими един от друг опита на бавно разбъркване.

*Определяне на времето за уравнивяване*

39. Приема се, че равновесието е достигнато, когато след регресионен анализ на отношението на концентрациите 1-октанол/вода за период с четири времеви точки се получи наклон, който не се различава значително от нула на р-ниво 0,05. Минималното време за уравнивяване е един ден преди да започне вземането на пробите. Като практическо правило, вземането на проби от вещества с прогнозна стойност на  $\log P_{OW}$  по-малка от пет може да стане през втория и третия ден. Може да се наложи уравнивяването за по-хидрофобни съединения да бъде удължено. За съединение с  $\log P_{OW}$  8,23 (декалхлоробифенил) бяха достатъчни 144 часа за уравнивяване. Постигането на равновесие се оценява чрез повтарящо се пробовземане от един и същ съд.

*Започване на опита*

40. В началото на опита реакционният съд се напълва с вода, наситена с 1-октанол. Остава се достатъчно време, за да се достигне термостатираната температура.
41. В реакционния съд внимателно се добавя желаното количество изпитвано вещество (разтворено в необходимото количество 1-октанол, наситен с вода). Тази стъпка е от решаващо значение за опита, тъй като трябва да се избягва турбулентно смесване на двете фази. За тази цел фазата на 1-октанол може да бъде добавена бавно с пипета върху стената на опитния съд, близо до водната повърхност. Вследствие на това тя ще потече по стъклената стена и ще образува слой над водната фаза. Декантацията на 1-октанол директно в стъклената трябва да се избягва във всички случаи; не бива да се допуска капки 1-октанол да падат директно във водата.
42. След като започне разбъркването, скоростта на разбъркване трябва да се увеличава бавно. Ако двигателите за разбъркване не могат да бъдат настроени подходящо, следва да бъде разгледано използването на трансформатор. Скоростта на разбъркване трябва да се настрои така, че на разделящата повърхност между водата и 1-октанола да се образува водовъртеж с максимална дълбочина от 0,5 до 2,5 cm. Скоростта на разбъркване трябва да се намали, ако дълбочината на водовъртежа превиши 2,5 cm; в противен случай от капчици 1-октанол във водната фаза могат да се образуват микрокапчици, което ще доведе до завишена оценка на концентрацията на изпитваното вещество във водата. Препоръчва се максимална скорост на разбъркване, при която се образува водовъртеж с дълбочина 2,5 cm въз основа на резултатите от изследването за валидиране чрез кръгово изпитване (5). Така се прави компромис с постигането на бързо уравнивяване, като същевременно се ограничава образуването на микрокапчици от 1-октанол.

*Вземане на проби и обработка на пробите*

43. Уредът за разбъркване следва да се изключи преди пробовземането и да се изчака до преустановяване на движението на течностите. След като пробовземането завърши, уредът за разбъркване бавно се пуска отново, както е описано по-горе, а след това скоростта на разбъркване постепенно се увеличава.
44. Пробовземане от водната фаза се извършва от спирателния кран в дъното на реакционния съд. Винаги се изхвърля мъртвият обем вода, събран в крановете (приблизително 5 ml в съда, показан в допълнение 2). Водата в крановете не се разбърква и поради това не е в равновесие с основната маса. Отбележете обема на водните проби и се погрижете количеството изпитвано вещество, налично в изхвърлената вода, да бъде отчетено, когато се изготвя масовият баланс. Загубите от изпаряване следва да бъдат сведени до минимум, като се позволи водата да тече бавно в разделителната фуния, така че да не се наруши слойт вода/1-октанол.
45. Пробите от 1-октанол се вземат чрез изтегляне на малка аликвотна част (приблизително 100  $\mu$ l) от слоя 1-октанол с изцяло стъклено-метална 100 микролитрова спринцовка. Трябва да се внимава да не се наруши границата. Записва се обемът на взетата за проба течност. Малка аликвотна част е достатъчна, тъй като пробата от 1-октанол ще бъде разреждана.
46. Трябва да се избягват ненужни стъпки по прехвърляне на пробата. За тази цел обемът на пробата следва да се определи гравиметрично. При водни проби това се постига, като водната проба се събере в разделителна фуния, която вече съдържа необходимото количество разтворител.

*ДАНИИ И ДОКЛАДВАНЕ*

47. Според настоящия метод за изпитване  $P_{OW}$  се определя чрез провеждане на три опита с бавно разбъркване (три опитни единици) с изследваното съединение при едни и същи условия. Регресията, използвана за доказване на достигането на равновесие, следва да се основава на резултати от поне четири определяния на  $C_O/C_W$  в последователни времеви точки. Това позволява да се изчисли дисперсията като мярка за неопределеност на средната стойност, получена от всяка опитна единица.
48.  $P_{OW}$  може да се характеризира с дисперсията на данните, получени за всяка опитна единица. Тази информация се използва, за да се изчисли  $P_{OW}$  като средно претеглената стойност на резултатите от отделните опитни единици. За да се направи това като тежест се използва реципрочната стойност на дисперсията на резултатите от опитните единици. В резултат на това данните с големи колебания (изразени като дисперсия), които следователно са по-ненадеждни, оказват по-слабо влияние върху резултата, отколкото данни с малка дисперсия.

49. Аналогично се изчислява и претегленото стандартно отклонение. То характеризира повторяемостта на измерването на  $P_{OW}$ . Ниска стойност на претегленото стандартно отклонение показва, че определянето на  $P_{OW}$  е с голяма повторяемост в рамките на една лаборатория. Формалната статистическа обработка на данните е изложена по-долу.

#### Обработка на резултатите

*Доказателство за постигане на равновесие*

50. Логаритъмът на съотношението на концентрациите на изпитваното вещество в 1-октанол и във вода ( $\log(C_o/C_w)$ ) се изчислява за всяка времева точка на пробовземане. Постигането на химично равновесие се доказва, като съотношението се представя графично като функция на времето. Ако се получи плато при това графично представяне въз основа на поне четири поредни времеви точки, това показва, че е достигнато равновесие и съединението е напълно разтворено в 1-октанол. В противен случай изпитванията трябва да продължат, докато наклонът в четири поредни времеви точки не се различава значително от 0 на  $r$ -ниво 0,05, което показва, че  $\log C_o/C_w$  не зависи от времето.

*Изчисляване на  $\log P_{OW}$*

51. Стойността на  $\log P_{OW}$  на опитната единица се изчислява като средно претеглената стойност на  $\log C_o/C_w$  за тази част от кривата на  $\log C_o/C_w$  спрямо времето, за която е установено равновесие. Средно претеглената стойност се изчислява чрез претегляне на данните с реципрочната стойност на дисперсията, за да може влиянието на данните върху окончателния резултат да е обратнопропорционално на неопределеността на данните.

*Среден  $\log P_{OW}$*

52. Средната стойност на  $\log P_{OW}$  на различните опитни единици се изчислява като средна стойност на резултатите от отделните опитни единици, претеглени със съответните им дисперсии.

Изчислението се извършва по следната формула:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

където

$\log P_{OW,i}$  = стойността на  $\log P_{OW}$  на отделната опитна единица  $i$ ;

$\log P_{OW,Av}$  = средно претеглената стойност на отделните определяния на  $\log P_{OW}$ ;

$w_i$  = статистическата тежест, дадена на стойността на  $\log P_{OW}$  на опитната единица  $i$ .

Реципрочната стойност на дисперсията на  $\log P_{OW,i}$  се използва като ( $w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$ ).

53. Грешката в средната стойност на  $\log P_{OW}$  се оценява като повторяемостта на  $\log C_o/C_w$ , определена по време на равновесната фаза в отделните опитни единици. Тя се изразява като претегленото стандартно отклонение на  $\log P_{OW,Av}$  ( $\sigma_{\log P_{OW,Av}}$ ), което на свой ред е мярка за грешката, свързана с  $P_{OW,Av}$ . Претегленото стандартно отклонение може да бъде изчислено от претеглената дисперсия ( $\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$  както следва:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

Със символа  $n$  се обозначава броят на опитните единици.

#### Доклад от изпитването

54. Докладът от изпитването включва следната информация:

*Изпитвано вещество:*

- общоприето наименование, химично наименование, номер по CAS, структурна формула (указваща положение на белязаната част, когато се използва белязано вещество) и отосими физични и химични свойства (вж. точка 17),
- чистота (примеси) на изпитваното вещество,
- чистота на белязаната част на белязаните химикали и моларна активност (където е уместно),
- първоначалната оценка на  $\log P_{OW}$ , както и методите, използвани за получаване на стойността.

*Условия на изпитването:*

- дати на извършване на изследванията,
- температура по време на опита,
- обеми 1-октанол и вода в началото на изпитването,
- обеми на взетите проби от 1-октанол и вода,
- обеми 1-октанол и вода, останали в съдовете, в които се извършва изпитването,
- описание на използваните съдове за изпитване и условия за разбъркване (конструкция на бъркалката и на съда за изпитване, височина на водовъртежа в ml и, когато е налична: скорост на разбъркването),
- методи за анализ, използвани за определяне на изпитваното вещество, и граница на количествено определяне за съответния метод,
- време на вземане на пробите,
- рН на водната фаза и използваните буфери, когато рН е регулирано за молекули, които могат да съществуват в йонизирано състояние,
- брой на повторенията.

*Резултати:*

- повторемост и чувствителност на използваните методи за анализ,
- концентрации на изпитваното вещество, определени в 1-октанол и вода като функция на времето,
- доказване на масовия баланс,
- температура и стандартно отклонение или обхват на температурните стойности по време на опита,
- регресия на съотношението на концентрациите като функция на времето,
- средната стойност на  $\log P_{ow,Av}$  и стандартната грешка,
- обсъждане и интерпретиране на резултатите,
- примери за необработени данни от представителен анализ (всички необработени данни трябва да се съхраняват съгласно стандартите за добри лабораторни практики), включително добиви на сурогати, брой на нивата, използвани за калибриране (заедно с критериите за корелационния коефициент на калибрационната крива), и резултати от осигуряването на качество/контрола на качеството,
- когато е наличен: доклад за валидиране на процедурата за извършване на анализа (да се посочи в препратките).

**ПРЕПРАТКИ:**

- (1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.
- (2) Глава А.8. „Коефициент на разпределение“ от настоящото приложение.
- (3) Глава А.8. „Коефициент на разпределение“ от настоящото приложение.
- (4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.
- (5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- (6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

- (7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, NY.
  - (8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.
  - (9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.
  - (10) Глава А.6. „Разтворимост във вода“ от настоящото приложение.
  - (11) Глава В.7. „Разграждане — абиотично разграждане: хидролиза като функция от рН“ от настоящото приложение.
  - (12) Глава В.4. „Определяне на пряката биологична разградимост“ — части II—VII (методи от А до Е) от настоящото приложение.
  - (13) Глава А.4. „Налягане на парите“ от настоящото приложение.
  - (14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.
  - (15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.
  - (16) Leo A, Weininger D (1989). *Medchem Software Manual*. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
  - (17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
  - (18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.
  - (19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.
  - (20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
  - (21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.
  - (22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.
-



## Допълнение 1

Таблица за изчисляване на минималния обем вода, необходим за откриване на изпитвани вещества с различни стойности на  $\log P_{ow}$  във водната фаза

Допускания:

- Максимален обем на отделните аликвотни части = 10 % от общия обем; 5 аликвотни части = 50 % от общия обем.
- Концентрация на изпитваното вещество =  $0,7 \times$  разтворимост във всяка фаза. В случай на по-ниски концентрации ще са необходими по-големи обеми.
- Обем, използван за определянето на ГО = 100 ml.
- $\log P_{ow}$  спрямо  $\log S_w$  и  $\log P_{ow}$  спрямо SR ( $S_{oct}/S_w$ ) са репрезентативни в разумна степен за взаимовръзките по отношение на изпитваните съединения.

Оценка на  $S_w$ 

$\log P_{ow}$	уравнение	$\log S_w$	$S_w$ (mg/l)
4	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,035	1,084E+00
5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-3,192	6,427E-04

Оценка на  $S_{oct}$ 

$\log P_{ow}$	уравнение	$S_{oct}$ (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

Обща маса на изпитваното вещество (mg)	Маса <sub>окт</sub> /Маса <sub>вода</sub>	Маса <sub>H2O</sub> (mg)	Конц <sub>H2O</sub> (mg/l)	Маса <sub>окт</sub> (mg)	Конц <sub>окт</sub> (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Обща маса на изпитваното вещество (mg)	Маса <sub>ОКТ</sub> /Маса <sub>вода</sub>	Маса <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (mg)	Конц <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (mg/l)	Маса <sub>ОКТ</sub> (mg)	Конц <sub>ОКТ</sub> (mg/l)
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Изчисляване на обеми

**Минимален необходим за фазата на H<sub>2</sub>O обем за всяка концентрация на ГО**

log K <sub>ow</sub>	ГО (microgram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Обем, използван за ГО (l)	0,1					

Легенда към изчисленията

Представява < 10 % от общия обем на водната фаза, съд за уравнивяване с вместимост 1 литър.

Представява < 10 % от общия обем на водната фаза, съд за уравнивяване с вместимост 2 литра.

Представява < 10 % от общия обем на водната фаза, съд за уравнивяване с вместимост 5 литра.

Представява < 10 % от общия обем на водната фаза, съд за уравнивяване с вместимост 10 литра.

Надвишава 10 % дори в съд за уравнивяване 10 литра.

**Обобщение на необходимите обеми като функция на разтворимостта във вода и на log P<sub>ow</sub>**

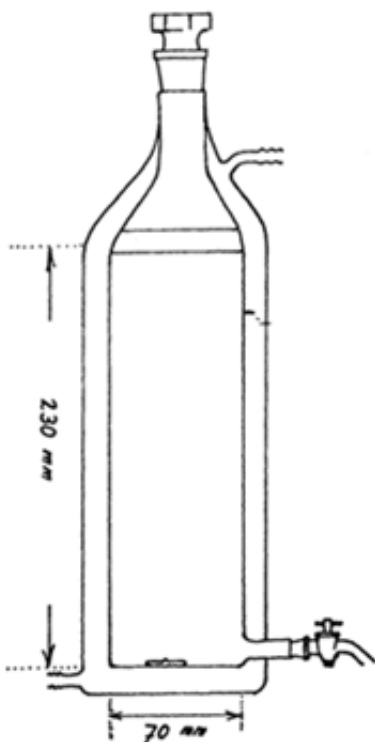
Минимален необходим за фазата на H<sub>2</sub>O обем за всяка концентрация на ГО (ml)

log P <sub>ow</sub>	S <sub>w</sub> (mg/l)	LOD (microgram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86

log P <sub>ow</sub>	S <sub>w</sub> (mg/l)	LOD (microgram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Обем, използван за ГО (l)		0,1.					

## Допълнение 2

Примерен съд за изпитване, покрит със стъкло, за опита с бавно разбъркване за определяне на  $P_{OW}$



3) Глава Б.2. се заменя със следното:

„Б.2. **ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ИНХАЛАТОРНА)**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 403 на ОИСП (2009 г.) (1). Първоначалното Указание за изпитване за остра инхалаторна токсичност 403 (TG 403) е прието през 1981 година. Настоящият преработен метод за изпитване Б.2. (като равностоеен на преработеното TG 403) е разработен така, че да бъде по-гъвкав, да се намали използването на животните, както и да задоволи нуждата от регулиране. Преработеният метод за изпитване включва два вида изследвания: Традиционен протокол за  $LC_{50}$  и протокол за Концентрация × Време ( $C \times t$ ). Първични характеристики на настоящия метод за изпитване са способността да предостави взаимовръзка концентрация-отговор, варираща от нелетален до летален изход, с цел извеждане на медианна летална концентрация ( $LC_{50}$ ), нелетална прагова концентрация (напр.  $LC_{01}$ ) и наклон на кривата, както и да идентифицира потенциална възприемчивост като функция от пола. Протоколът за Концентрация × Време следва да се използва, когато е налице специфична регулаторна или научна необходимост, която изисква изпитване на животни с различна продължителност, като например за целите на планирането на ответни действия при извънредни ситуации [например, за разработване на указателни стойности за равнищата на остра експозиция (AEG1), указателни стойности за планиране на ответни действия при извънредни ситуации (ERPG) или указателни стойности на прагови равнища на остра експозиция (AETL)], или за планиране на земеползването.
2. Указания за провеждането и интерпретирането на изследвания по настоящия метод за изпитване могат да бъдат намерени в Ръководството за изпитвания на остра инхалаторна токсичност (GD 39) (2).
3. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в края на тази глава и в GD 39 (2).
4. Настоящият метод за изпитване дава възможност за охарактеризиране на изпитвания химикал и за количествена оценка на риска, който представлява, и позволява степенуването и класифицирането на изпитваните химикали съгласно Регламент (ЕО) № 1272/2008 (3). GD 39 (2) предоставя указания за избора на подходящ метод за изпитване за остра токсичност. Когато се изисква информация само за класифициране и етикетирание, по принцип се препоръчва глава Б.5.2. от настоящото приложение (4) [вж. GD 39 (2)]. Настоящият метод за изпитване Б.2. не е специално предназначен за изпитването на специализирани материали, като малко разтворими изометрични или влакнести материали, или произведени наноматериали.

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

5. Преди обсъждането на изпитване в съответствие с настоящия метод за изпитване цялата налична информация за изпитвания химикал, включително съществуващите изследвания [например глава Б.52. от настоящото приложение (4)], чиито данни са в подкрепа да не се извършва допълнително изпитване, следва да бъдат разгледани от лабораторията, извършваща изпитвания, с цел да се сведе до минимум използването на животни. Информацията, която може да помогне при избора на най-подходящия вид, порода, пол, режим на експозиция, и на подходящи концентрации за изпитване, включва идентификацията на изпитвания химикал, неговата химична структура и физичните и химичните му свойства; резултатите от всякакви изпитвания за токсичност, извършени *in vitro* или *in vivo*; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност и токсикологични данни за вещества със сходна структура [вж. GD 39 (2)].
6. Следва да се избягва, доколкото е възможно, изпитване на корозивни и/или дразнещи изпитвани химикали при концентрации, които се очаква да предизвикат силна болка и/или дистрес. Потенциалът за корозивно/дразнещо действие следва да се оценява чрез експертна оценка с използване на доказателства като човешки опит и опит с животни (напр. от изследвания с повтарящи се дози, проведени при концентрации с некорозивно/дразнещо действие), съществуващи данни за *in vitro* (напр. от глави Б.40. (5), Б.40А. (6) от настоящото приложение, или ОИСП TG 435 (7)), стойности на рН, информация за сходни вещества или всякакви други подходящи данни, за целите на проучването дали може да бъде отменено по-нататъшно изпитване. За специфични регулаторни нужди (напр. при планиране за извънредни ситуации), настоящият метод за изпитване може да се използва за експозиция на животни на тези материали, защото предоставя на ръководителя на изследването или на главния изследовател контрол върху избора на целеви концентрации. Въпреки това, целевите концентрации следва да не предизвикват силно дразнещи/корозивни ефекти, но да са достатъчни, за да се разшири кривата концентрация-отговор до равнища, при които се постига регулаторната и научната цел на изпитването. Тези концентрации следва да бъдат подбрани за всеки отделен случай и следва да се предостави обосновка за избора на концентрацията [вж. GD 39 (2)].

**ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО**

7. Настоящият преработен метод за изпитване Б.2. е разработен така, че да бъде получена достатъчно информация за острата токсичност на изпитвания химикал, която дава възможност за неговото класифициране, и да се предоставят данни за леталността (напр. LC<sub>50</sub>, LC<sub>01</sub> и наклон) за единия от половете или за двата пола, необходими за количествена оценка на риска. При настоящия метод за изпитване се предлагат два метода. Първият метод е традиционен протокол, в който има експозиция на групи от животни на пределна концентрация (изпитване при пределна концентрация) или на поредица от концентрации чрез прилагане на поетапна процедура с предварително определена продължителност, обичайно равна на 4 часа. Друга продължителност на експозицията може да се прилага за изпълнение на специфични регулаторни цели. Вторият метод е протокол (C × t), в който има експозиция на групи от животни на една (пределна концентрация) или на поредица от множество концентрации с множество продължителности.
8. Умиращи животни или животни, очевидно изпитващи болка или показващи признаци на силен и продължителен дистрес, следва да бъдат умъртвявани по хуманен начин, като при интерпретирането на резултатите от изпитванията те се третират по същия начин, както животните, умрели по време на изпитването. Критериите за вземане на решение за умъртвяване на умиращи или силно страдащи животни и указанията за разпознаване на предвидима или неизбежна смърт са предмет на Ръководство на ОИСП № 19 за хуманен край (8).

**ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Избор на животински вид**

9. Следва да се използват здрави млади полово зрели животни от обичайно употребяваните за лабораторни изследвания породи. Предпочитаният вид е плъхът и трябва да се представи обосновка, ако са използвани други видове.

**Подготовка на животните**

10. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. Към деня на експозицията животните следва да са млади полово зрели индивиди на възраст от 8 до 12 седмици и с телесно тегло в рамките на ± 20 % от средното тегло за всеки пол за всички по-рано експонирани животни от същата възраст. Животните се избират произволно и се маркират за индивидуална идентификация. Животните се държат в техните клетки най-малко 5 дни преди началото на изпитването, за да се даде възможност за аклиматизиране към лабораторните условия. Необходимо е също животните да се аклиматизират към изпитвателната апаратура за кратък период преди изпитването, тъй като това ще намали стреса, предизвикан от въвеждането в новата среда.

**Отглеждане на животните**

11. Температурата на помещението, в което се отглеждат опитните животни, следва да бъде 22 ± 3 °C. В идеалния случай относителната влажност следва да бъде поддържана в интервала от 30—70 %, макар че поддържането в този интервал може да не е възможно, когато се използва вода като носител. Преди и след експозициите животните обичайно следва да се поставят в клетките в групи по пол и концентрация, но броят на животните в дадена клетка не следва да възпрепятства точните наблюдения над всяко животно и следва да свежда до минимум загубите поради канибализъм и борба. За животни, при които експозицията е само през носа, може да е необходимо същите да бъдат аклиматизирани към ограничителните тръби. Ограничителните тръби не следва да причиняват ненужен стрес у животните поради физични, термични или причини, свързани с обездвижване. Ограничаването може да засегне физиологични крайни точки като телесната температура (хипертермия) и/или минутния дихателен обем. Ако са налични типови данни, които показват, че не настъпват такива осезаеми промени, тогава не е необходимо предварително адаптиране към ограничителните тръби. Животни, при които

експозицията на аерозол е на цялото тяло, следва да се настаняват отделно по време на експозицията, за да се предотврати възможността животното да филтрува изпитвания аерозол през козината на намиращи се в същата клетка други животни. Освен по време на експозицията, могат да се използват конвенционални и сертифицирани лабораторни храни, придружени с неограничено количество битова питейна вода. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина/12 часа тъмнина.

#### **Инхалационни камери**

12. При избора на инхалационна камера следва да бъдат разгледани естеството на изпитвания химикал и целта на изпитването. Предпочитаният начин на експозиция е само през носа (в този термин се включват експозиции само на главата, само през носа или само през муцуната). Експозицията само през носа обичайно се предпочита при изследване на течни и твърди аерозоли, както и на пари, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. Специалните цели на изследването могат да се постигнат по-добре чрез използване на режим на експозиция на цялото тяло, но това следва да бъде обосновано в доклада от изследването. За да се гарантира стабилност на атмосферата при използване на камера за експозиция на цялото тяло, общият обем на изпитваните животни не трябва да надвишава 5 % от обема на камерата. Принципите на техниките за експозиция само през носа и за експозиция на цялото тяло и техните специфични предимства и недостатъци са описани в GD 39 (2).

#### **УСЛОВИЯ НА ЕКСПОЗИЦИЯ**

##### **Прилагане на концентрациите**

13. Експозициите само през носа при плъхове могат да бъдат с произволна продължителност, най-много до 6 часа. Експозициите само през носа при мишки по принцип не трябва да надвишават 4 часа. Ако са необходими изследвания при по-голяма продължителност, трябва да се представи обосновка [вж. GD 39 (2)]. Животните, експонирани на аерозоли в камери за цялото тяло, следва да се настаняват поотделно, за да се предотврати поглъщането на изпитвания химикал в резултат от поддържане на външния вид на други индивиди в същата клетка. По време на експозицията не трябва да се дава храна. Вода може да се дава по време на експозиция на цялото тяло.
14. Животните се експонират на изпитвания химикал, който представлява газ, пари, аерозол или смес от тях. Агрегатното състояние, което трябва да бъде изпитано, зависи от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, избраната концентрация, и/или най-вероятната физична форма по време на манипулирането и употребата на изпитвания химикал. Хигроскопични и химически реактивоспособни изпитвани химикали следва да бъдат изпитвани в среда от сух въздух. Следва да се полагат грижи за избягване достигането на концентрации, при които може да бъде причинена експлозия.

##### **Разпределение според размера на частиците**

15. Следва да бъде извършено определяне на размера на частиците за всички аерозоли и за парите, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. За да могат да бъдат експонирани всички относими части на дихателните пътища се препоръчват аерозоли с диаметър, равен на аеродинамичния диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD), намиращ се в диапазон от 1 до 4  $\mu\text{m}$ , и с геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ) в диапазон от 1,5 до 3,0 (2) (9) (10). Въпреки че следва да се положи разумно усилие за спазване на този стандарт, ако това не може да бъде постигнато следва да бъде предоставена експертна оценка. Например стойностите за метални пари могат да бъдат по-малки от този стандарт, а за заредени частици, влакна и хигроскопични материали (които увеличават размера си във влажната среда на дихателните пътища) могат да надхвърлят този стандарт.

##### **Подготовка на изпитвания химикал в носител**

16. За постигане на подходяща концентрация и размер на частиците на изпитвания химикал в атмосферата може да бъде използван носител. По правило следва да бъде предпочитана водата. Частиците от даден материал могат да бъдат подложени на механични процеси, за да се постигне изискваното разпределение според размера на частиците, но трябва да се вземат мерки изпитвания химикал да не бъде разложен или променен. В случаите, когато се предполага, че механичните процеси са довели до изменение на състава на изпитвания химикал (например причинена от триене много висока температура в резултат от прекомерно смилане), съставът на изпитвания химикал следва да бъде проверен по аналитичен път. Следва да бъдат взети адекватни мерки да не се допусне замърсяване на изпитвания химикал. Не е необходимо да се изпитват неронливи гранулирани материали, които са целенасочено изготвени така, че да не могат да бъдат инхалирани. За да се докаже, че при манипулирането на гранулирания материал не се произвеждат частици, които могат да бъдат вдишвани, следва да се приложи изпитване чрез триене. Ако при изпитване чрез триене бъдат произведени частици, които могат да бъдат вдишвани, следва да се извърши изпитване за инхалаторна токсичност.

##### **Контролни животни**

17. Паралелна отрицателна контролна група (въздух) не е необходима. Когато за подпомагане генерирането на атмосферата за изпитване се използва носител, различен от вода, контролна група за носителя следва да се използва само в случай че не са достъпни данни за минали периоди за инхалаторна токсичност. Ако при дадено изследване за токсичност на изпитван химикал в състав с носител не бъде установена токсичност, от това следва, че носителят не е токсичен при концентрацията на изпитване; следователно не е необходима контрола за носителя.

#### **МОНИТОРИНГ НА УСЛОВИЯТА НА ЕКСПОЗИЦИЯ**

##### **Въздушен поток в камерата**

18. Въздушният поток през камерата трябва да бъде внимателно контролиран, непрекъснато наблюдаван и записван най-малко на всеки час по време на всяка експозиция. Мониторингът на концентрацията (или стабилността) на атмосферата за изпитване представлява цялостно измерване на всички динамични параметри и предоставя непряко

средство за контрол на всички относими динамични параметри, свързани с генериране на атмосфера. Специално внимание следва да се обърне на избягване, при камери за експозиция само през носа, на повторно инхалиране в случаи, при които системата за експозиция не може да осигури адекватна динамика на потока на атмосферата с изпитвания химикал. Съществуват предписани методологии, които могат да се използват за доказване, че в рамките на избраните работни условия не настъпва повторно инхалиране (2) (11). Концентрацията на кислород следва да бъде не по-малко от 19 %, а концентрацията на въглероден диоксид не трябва да превишава 1 %. Ако има основание да се смята, че тези стандарти не могат да бъдат спазени, концентрациите на кислорода и на въглеродния диоксид следва да се измерват.

#### Температура и относителна влажност на камерата

19. Температурата в камерата трябва да се поддържа на  $22 \pm 3$  °C. Относителната влажност в зоната на дишане на животните — както за експозиция само през носа, така и за експозиция на цялото тяло — трябва да бъде наблюдавана и записвана най-малко три пъти за продължителности до 4 часа и на всеки час за по-кратки продължителности. В идеалния случай относителната влажност трябва да бъде поддържана в диапазона между 30 и 70 %, но това може или да се окаже непостижимо (например при изпитване на смеси на основата на вода), или да не може да бъде измерено поради въздействие на изпитвания химикал върху метода за изпитване.

#### Изпитван химикал: Номинална концентрация

20. Когато е осъществимо, номиналната концентрация в камерата за експозиция следва да се изчислява и записва. Номиналната концентрация е масата на генерирания изпитван химикал, разделена на общия обем въздух, преминал през камерната система. Номиналната концентрация не се използва за характеризиране на експозицията на животните, а сравнение на номиналната и действителната концентрация дава показание за ефикасността на генериране на системата за изпитване и следователно може да се използва за откриване на проблеми при генерирането.

#### Изпитван химикал: Действителна концентрация

21. Действителната концентрация е концентрацията на изпитвания химикал в зоната на дишане на животните в дадена инхалационна камера. Действителни концентрации могат да бъдат получени чрез специфични методи (например чрез пряко пробовземане, свързани с адсорбция или с химична реакция методи и последващо аналитично охарактеризиране) или чрез неспецифични методи като гравиметричен анализ с филтруване. Използването на гравиметричен анализ е приемливо само за еднокомпонентни прахови аерозоли или за аерозоли от ниско летливи течности и следва да бъде подпомогнато от подходящо специфично за изпитвания химикал охарактеризиране чрез предварително изследване. Концентрацията на многокомпонентни прахови аерозоли също може да бъде определяна чрез гравиметричен анализ. Това обаче изисква аналитични данни, които доказват, че съставът на намиращия се във въздуха материал е подобен на този на изходния материал. Ако тази информация не е налична, може да е необходимо извършване на анализ на изпитвания химикал (в идеалния случай в състоянието, в което е разтворен във въздуха), повтарящо се на редовни интервали по време на изследването. За агенти в аерозолна форма, които могат да се изпаряват или да сублимират, следва да се покаже, че всички фази са събрани по избрания метод. Целевата, номиналната и действителната концентрации следва да бъдат посочени в доклада от изследването, но в статистически анализи за изчисляване на стойностите на леталната концентрация се използват само действителните концентрации.
22. По възможност следва да се използва една партида от изпитвания химикал, като изпитваната проба следва да се съхранява при условия, при които се поддържат нейната чистота, хомогенност и устойчивост. Преди началото на изследването следва да се извърши охарактеризиране на изпитвания химикал, включително неговата чистота и, ако е технически осъществимо, идентичността, както и количествата на определените замърсители и примеси. Това може да бъде доказано от, но не се ограничава до, следните данни: време на задържане и относителна площ на пика, получена чрез маспектрометричен или газово-хроматографски анализ молекулна маса, или други оценки. Въпреки че лабораторията, извършваща изпитвания, не носи отговорност за идентифицирането на пробата за изпитване, може да е разумно лабораторията, извършваща изпитвания, да потвърди охарактеризирането на финансиращия, дори и в ограничена степен (например цвят, физична природа и др.).
23. Атмосферата на експозицията трябва да бъде поддържана постоянна, доколкото е практически възможно, и да бъде наблюдавана непрекъснато и/или периодически в зависимост от метода за анализ. Когато се прилага периодически пробовземане пробите от атмосферата в камерата трябва да се вземат най-малко два пъти при четиричасово изследване. Ако това е практически неосъществимо поради ограничена скорост на въздушния поток или ниска концентрация, през целия период на експозиция може да бъде извършено само едно пробовземане. Ако се получат значителни колебания в стойностите между отделните проби, следващите концентрации следва да бъдат изпитвани с четири пробовземания на експозиция. Индивидуалните стойности на концентрациите в камерата не трябва да се отклоняват от средната концентрация с повече от  $\pm 10$  % за газовете и парите или  $\pm 20$  % за течните или твърдите аерозоли. Времето за уравнивяване на камерата ( $t_{95}$ ) следва да се изчислява и записва. Продължителността на дадена експозиция обхваща времето, за което се генерира изпитваният химикал, като при това се взема предвид изискваният период за постигане на  $t_{95}$ . Указания за оценката на  $t_{95}$  могат да бъдат намерени в GD 39 (2).
24. При много сложни смеси, съставени от газове/пари и аерозоли (например атмосфера след горене и изпитвани химикали, отделяни от целеви продукти/оборудване за крайна употреба), всяка фаза може да реагира по различен начин в инхалационната камера и следователно от всяка фаза (газ/пари и аерозол) следва да бъде избрано най-малко едно вещество (аналит), служещо като показател, като обичайно това е основното активно вещество в сместа. Когато изпитваният химикал е смес, аналитичната концентрация следва да се докладва за сместа, а не само за активното вещество или за компонента (аналита). Допълнителна информация относно действителните концентрации може да бъде намерена в GD 39 (2).

**Изпитван химикал: Разпределение според размера на частиците**

25. Разпределението според размера на частиците на аерозоли трябва да се определи най-малко два пъти по време на всяка 4-часова експозиция, като се използва каскаден импактор или алтернативен инструмент, като например спектрометър за определяне на размера на аеродинамични частици. Ако може да бъде доказана равностойността на резултатите, получени от каскадни импактор и от алтернативния инструмент, тогава алтернативният инструмент може да бъде използван по време на цялото изследване. Успоредно с основния инструмент следва да бъде използвано второ устройство, като например гравиметричен филтър или погълтител с въвеждаща тръбичка (импинджер)/барботиращ апарат, за да се потвърди ефикасността на пробовземането на основния инструмент. Масовата концентрация, получена чрез анализ на размера на частиците, следва да бъде в рамките на разумни граници от масовата концентрация, получена чрез анализ с филтруване [вж. GD 39 (2)]. В случай че тяхната равностойност може да бъде доказана в ранния етап на изследването, могат да не се извършват допълнителни измервания за потвърждение. От съображения за хуманно отношение към животните следва да се вземат мерки за свеждане до минимум на недостатъчните за формулиране на заключение данни, които могат да доведат до необходимост от повтаряне на дадена експозиция. Определяне на размера на частиците трябва да бъде извършено за пари, ако съществува вероятност кондензация на парите да доведе до образуване на аерозол, или ако бъдат открити частици в атмосфера от пари с потенциал за смесени фази (вж. точка 15).

**ПРОЦЕДУРА**

26. По-долу са описани два вида изследвания: традиционният протокол и протоколът  $C \times t$ . И двата протокола могат да включват зрительно изследване, основно изследване, и/или изпитване при пределна концентрация (традиционен протокол), или изпитване при максимална пределна концентрация ( $C \times t$ ). Ако е известно, че единият пол е по-възприемчив, ръководителят на изследването може да избере тези изследвания да бъдат извършени само с използване на по-възприемчивия пол. Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Преди започване на изследването следва да бъдат разгледани всички достъпни данни, за да се сведе до минимум използването на животни. Например данни, получени с използването на глава Б.52. от настоящото приложение (4), могат да премахнат необходимостта от зрители изследвания, и могат също така да покажат дали единият пол е по-възприемчив [вж. GD 39 (2)].

**ТРАДИЦИОНЕН ПРОТОКОЛ****Общи съображения: Традиционен протокол**

27. При традиционното изследване групи животни се експонират на изпитван химикал за определен период от време (обичайно 4 часа) в камера за експозиция само през носа, или в камера за експозиция на цялото тяло. Животните се експонират или на максимална пределна концентрация (изпитване при пределна концентрация), или най-малко на три концентрации чрез прилагане на поетапна процедура (основно изследване). Основното изследване може да бъде предшествано от зрительно изследване, освен ако са достъпни някакви данни за изпитвания химикал, като например предходно изследване по глава Б.52. [вж. GD 39 (2)].

**Зрительно изследване: Традиционен протокол**

28. Зрительното изследване се използва за изчисляване на ефикасността на изпитвания химикал, за установяване на евентуални разлики във възприемчивостта между половите и за подпомагане при избора на равнищата на експозиционна концентрация за основното изследване или изпитване при пределна концентрация. При избора на равнища на концентрация за зрительното изследване следва да се използва цялата достъпна информация, включително достъпни данни за (количествена) зависимост структура-активност и данните за подобни химикали. Не повече от три мъжки и три женски екземпляра следва да бъдат експонирани на всяка концентрация (възможно е да са необходими 3 животни/пол, за да се установи евентуална разлика, свързана с половите). Дадено зрительно изследване може да се състои от една-единствена концентрация, но ако е необходимо могат да бъдат изпитвани повече концентрации. При зрительното изследване не следва да се изпитват голям брой животни и концентрации по такъв начин, че същото да наподобява основно изследване. Вместо зрительно изследване може да се използва предходно изследване по глава Б.52. (4) [вж. GD 39 (2)].

**Изпитване при пределна концентрация: Традиционен протокол**

29. Изпитване при пределна концентрация се използва, когато се знае или се очаква изпитваният химикал да бъде практически нетоксичен, т.е. предизвикващ токсичен отговор само над нормативно определената пределна концентрация. При изпитване при пределна концентрация единствена група от три мъжки и три женски екземпляра се експонират на изпитвания химикал на максимална пределна концентрация. Информация за токсичността на изпитвания химикал може да бъде получена от познания за подобни изпитани химикали, като се вземат предвид идентичността и процентното съдържание на компонентите, за които е известно, че са с токсикологично значение. В случаите, когато има малко или няма информация за неговата токсичност, или при които се очаква изпитваният химикал да бъде токсичен, следва да се провежда основното изследване.
30. Изборът на пределните концентрации обикновено зависи от регулаторни изисквания. При прилагане на Регламент (ЕО) № 1272/2008 максималните пределни концентрации за газове, пари, и аерозоли са съответно 20 000 ppm, 20 mg/l и 5 mg/l (или максимално достижимата концентрация) (3). Генерирането на максимални пределни концентрации за някои изпитвани химикали, особено под формата на пари и аерозоли, може да бъде предизвикателство от техническа гледна точка. При изпитване на аерозоли основната цел следва да бъде постигането на размер на частиците, позволяващ вдишването им (MMAD от 1—4 µm). Това е възможно за повечето изпитвани химикали при концентрация от 2 mg/l. Изпитване на аерозоли при концентрация по-висока от 2 mg/l следва да се извършва само ако може да бъде постигнат размер на частиците, позволяващ вдишването им [вж. GD 39 (2)]. Регламент (ЕО) № 1272/2008 не насърчава изпитвания с концентрация, превишаваща пределната концентрация от съображения за хуманно отношение към животните (3). Пределната концентрация следва да бъде взета предвид само, когато има голяма вероятност резултатите от такова изпитване да имат пряко практическо значение за опазване здравето на хората (3) и следва да бъде представена обосновка в доклада от изследването. В случай на потенциално взривоопасни изпитвани химикали следва да се положат усилия за избягване на условия, предразполагащи експлозия. С оглед избягване на ненужно използване на животни следва да се извърши изпитване без животни преди изпитването при пределна концентрация, за да се гарантира, че в камерата могат да бъдат постигнати условията за изпитването при пределна концентрация.



31. Ако при пределна концентрация се наблюдава смъртност или терминално състояние, резултатите от изпитването при пределна концентрация могат да послужат като зрительно изследване за по-нататъшно изпитване при други концентрации (вж. основното изследване). Ако поради физични или химични свойства на изпитвания химикал е невъзможно да бъде постигната пределна концентрация, на изпитване трябва да бъде подложена максимално достижимата концентрация. В случай, че при максимално достижимата концентрация достигнатата леталност е по-малка от 50 %, не е необходимо по-нататъшно изпитване. Ако пределната концентрация не е била достигната, в доклада от изследването следва да се съдържа обяснение и подкрепящи данни. Ако максимално достижимата концентрация на пари не предизвиква токсичност, може да се наложи изпитваният химикал да бъде генериран като течен аерозол.

**Основно изследване: Традиционен протокол**

32. Основното изследване обичайно се извършва, като се използват пет мъжки и пет женски екземпляра (или 5 животни от по-възприемчивия пол, ако е известен) за равнище на концентрация, с най-малко три равнища на концентрация. Следва да се използват достатъчни равнища на концентрация, за да се постигне устойчив статистически анализ. Времевият интервал между групите за експозиция се определя от първоначалното появяване на токсичните признаци и от тяхната продължителност и сила. Експонирането на животните на следващото равнище на концентрация следва да бъде забавено, докато се получи достатъчна увереност за преживяемост на изпитваните преди това животни. Това позволява на ръководителя на изследването да адаптира целевата концентрация за следващата група за експозиция. Поради зависимостта от сложни технологии това може да не е винаги практично при изследвания по инхалаторен път, поради което експозицията на животни на следващото равнище на концентрация следва да се основава на предходно придобит опит и научна преценка. При изпитването на смеси следва да бъде консултиран източник GD 39 (2).

**ПРОТОКОЛ ЗА КОНЦЕНТРАЦИЯ × ВРЕМЕ (C × T)**

**Общи съображения: Протокол C × t**

33. Поетапното изследване C × t може да бъде разглеждано като алтернатива на традиционния протокол при оценка на инхалаторната токсичност (12) (13) (14). Този подход позволява животните да бъдат експонирани на изпитван химикал на няколко равнища на концентрация и с множество различни продължителности. Всички изпитвания се извършват в камера за експозиция само през носа (камерите за експозиция на цялото тяло не са практични за настоящия протокол). Настоящият протокол е илюстриран в технологична диаграма в допълнение 1. Чрез симулационен анализ е установено, че и при традиционния протокол, и при протокола C × t могат да бъдат получени устойчиви стойности за LC<sub>50</sub>, но по принцип протоколът C × t е по-ефективен при получаване на устойчиви стойности за LC<sub>01</sub> и LC<sub>10</sub> (15).
34. Чрез симулационен анализ е доказано, че използването на две животни на интервал C × t (по едно от всеки един от двата пола, или две от по-възприемчивия пол) може по принцип да е подходящо при изпитването на 4 концентрации и 5 продължителности на експозицията при основно изследване. При някои обстоятелства ръководителят на изследването може да избере да използва два пъхва от пол за интервал C × t (15). Използването на 2 животни от пол за концентрация и времева точка може да намали изместването и варирането на оценките, да увеличи процента на събдяване на оценките и да разшири доверителния интервал. Въпреки това, при стойност, която не е достатъчно близка до данните за оценка (когато се използва по едно животно от всеки пол или две животни от по-възприемчивия пол), е възможно 5-а експозиционна концентрация също да е достатъчна. Допълнителни указания относно броя на животните и концентрациите, които да се използват в изследване C × t, могат да бъдат намерени в GD 39 (2).

**Зрительно изследване: Протокол C × t**

35. Зрительното изследване се използва за изчисляване на ефикасността на изпитвания химикал и за подпомагане при избора на равнищата на експозиционна концентрация за основното изследване. За избор на подходяща начална концентрация за основното изследване и за свеждане до минимум броя на използваните животни може да бъде необходимо зрительно изследване, при което се използват до три животни от пол на концентрация [за подробна информация вж. допълнение III от GD 39 (2)]. Може да се наложи да се използват три животни от пол, за да се установи разлика по отношение на половете. Тези животни трябва да бъдат експонирани с единична продължителност, обичайно 240 минути. Възможността за генериране на подходяща атмосфера за изпитване следва да бъде оценена по време на предварителни технически изпитвания без животни. По принцип не е необходимо извършване на зрительно изследване, ако са достъпни данни за смъртността от изследване по Б.5.2. (4). При избора на първоначалната целева концентрация в изследване по Б.2. ръководителят на изследването следва да разгледа наблюдаваните модели на смъртността във всяко достъпно изследване по Б.5.2. (4) за двата пола и при всички изпитани концентрации [вж. GD (2)].

**Първоначална концентрация: Протокол C × t**

36. Първоначалната концентрация (сесия I от експозицията) (допълнение 1) ще е или пределна концентрация, или концентрация, избрана от ръководителя на изследването въз основа на зрительното изследване. Групи от 1 животно/пол се експонират на тази концентрация за многократни продължителности (например 15, 30, 60, 120 или 240 минути), като в резултат се получава общ брой от 10 животни (т.нар. сесия I от експозицията) (допълнение 1).
37. Изборът на пределните концентрации обикновено зависи от регулаторни изисквания. При прилагане на Регламент (ЕО) № 1272/2008 максималните пределни концентрации за газове, пари, и аерозоли са съответно 20 000 ppm, 20 mg/l и 5 mg/l (или максимално достижимата концентрация) (3). Генерирането на максимални пределни концентрации за някои изпитвани химикали, особено под формата на пари и аерозоли, може да бъде предизвикателство от техническа гледна точка. При изпитване на аерозоли целта следва да бъде постигането на размер на частиците, позволяващ вдишването им (т.е. MMAD от 1—4 µm) при пределна концентрация от 2 mg/l. Това е възможно при повечето изпитвани химикали. Изпитване на аерозоли при концентрация по-висока от 2 mg/l следва да се извършва само ако може да бъде постигнат размер на частиците, позволяващ вдишването им [вж. GD 39 (2)]. Регламент (ЕО) № 1272/2008 не насърчава изпитвания с концентрация, превишаваща пределната

концентрация, от съображения за хуманно отношение към животните (3). Изпитване с концентрация, превишаваща пределната концентрация, следва да бъде взето предвид само когато има голяма вероятност резултатите от такова изпитване да имат пряко практическо значение за опазване здравето на хората (3) и следва да бъде представена обосновка в доклада от изследването. В случай на потенциално взривоопасни изпитвани химикали следва да се положат усилия за избягване на условия, предразполагащи експлозия. С оглед избягване на ненужно използване на животни следва да се извърши изпитване без животни преди изпитването при първоначална концентрация, за да се гарантира, че в камерата могат да бъдат постигнати условията при тази концентрация.

38. Ако при първоначална концентрация се наблюдава смъртност или терминално състояние, резултатите от изпитването при посочената концентрация могат да послужат като начална точка за по-нататъшно изпитване при други концентрации (вж. основното изследване). Ако поради физични или химични свойства на изпитвания химикал е невъзможно да бъде постигната пределна концентрация, на изпитване трябва да бъде подложена максимално достижимата концентрация. В случай, че при максимално достижимата концентрация достигнатата леталност е по-малка от 50 %, не е необходимо по-нататъшно изпитване. Ако пределната концентрация не може да бъде достигната, в доклада от изследването следва да се съдържа обяснение и подкрепящи данни. Ако максимално достижимата концентрация на пари не предизвиква токсичност, може да се наложи изпитваният химикал да бъде генериран като течен аерозол.

#### Основно изследване: Протокол $C \times t$

39. Първоначалната концентрация (сесия I от експозицията) (допълнение 1), изпитвана при основното изследване, се е или пределна концентрация, или концентрация, избрана от ръководителя на изследването въз основа на зрителното изследване. Ако по време на или след сесия I на експозицията е наблюдавана смъртност, минималната експозиция ( $C \times t$ ), в резултат на която е наблюдавана смъртност, се взема като насочваща за установяване на концентрацията и продължителностите при сесия II на експозицията. Всяка последваща сесия на експозицията зависи от предходната сесия (вж. допълнение 1).
40. За много от изпитваните химикали резултатите, получени при първоначалната концентрация, заедно с три допълнителни сесии на експозиция с по-малка стъпка при графичното изобразяване на времето (т.е. определяне на последователните периоди на експозиция чрез геометрична прогресия с частно, обичайно равно на  $\sqrt{2}$ ), ще бъде достатъчно, за да се установи връзката със смъртността преи  $C \times t$  (15), но може да има известна полза да се използва 5-а експозиционна концентрация [вж. Допълнение 1 и GD 39 (2)]. За математическа обработка на резултатите за протокол  $C \times t$  вж. допълнение 1.

#### НАБЛЮДЕНИЯ

41. Върху животните трябва да бъдат извършвани чести клинични наблюдения по време на периода на експозиция. След експозицията клинични наблюдения следва да бъдат извършвани най-малко два пъти в деня на експозицията, или по-често, ако има показания от отговора на животните на третирането, и най-малко един път дневно след това общо в продължение на 14 дни. Продължителността на периода на наблюдение не е фиксирана, но следва да се определя от характера и времето на поява на клиничните признаци и от продължителността на възстановителния период. Моментите във времето, в които признаците на токсичност се появяват и изчезват, са важни, особено ако съществува тенденция към забавяне появата на признаците на токсичност. Всички наблюдения систематично се записват с индивидуални архиви, които се поддържат за всяко животно. Животните, намерени в терминално състояние, и животните, показващи признаци на силна болка и/или продължителни признаци на силен дистрес, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин по причини, свързани с хуманното отношение към животните. При провеждането на изследвания за клинични признаци на токсичност трябва да се внимава първоначално трудно забележимите и преходните респираторни промени в резултат от процедурата по експозицията да не бъдат взети погрешно за токсичност, свързана с изпитвания химикал, което би изисквало преждевременно умъртвяване на животните. Следва да бъдат взети предвид принципите и критериите, обобщени в Ръководството за хуманен край (GD 19) (7). Когато животните са умъртвени по хуманни причини или са намерени мъртви, времето на смъртта им следва да бъде записано колкото е възможно по-точно.
42. Наблюденията в клетките следва да включват изменения в кожата и козината, очите и лигавиците, също и в дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, както и в соматомоторната активност и поведението на животните. Всякакво разграничение между локални и системни ефекти трябва да бъде отбелязвано, когато е възможно. Вниманието следва да бъде насочено към наблюдения на треперене, конвулсии, слюнотделение, диария, летаргия, сън и кома. Измерването на ректална температура може да предостави подкрепящи доказателства за рефлекторно забавено дишане или хипотермия/хипертермия, свързани с третирането или затвореното пространство.

#### Телесно тегло

43. Индивидуалното тегло на животните следва да бъде записано веднъж през периода на аклиматизация, в деня на експозицията преди експозиция (ден 0), и най-малко през дни 1, 3 и 7 (и след това един път седмично), и към момента на настъпване на смъртта или евтаназията, ако е след ден 1. Телесното тегло е признато като изключително важен показател за токсичност и следователно животни, проявяващи устойчиво снижаване с  $> 20\%$  в сравнение със стойностите от предварителното изследване, трябва да бъдат стриктно наблюдавани. В края на периода след експозицията преживелите животни се претеглят и след това се умъртвяват по хуманен начин.

#### Патология

44. Всички изпитвани животни, включително умрелите по време на изпитването или подложените на евтаназия и извадени от изследването поради причини, свързани с хуманното отношение към животните, следва да бъдат подложени на макроскопска аутопсия. Ако аутопсията не може да се извърши веднага след откриването на мъртвото животно, трупуът на животното трябва да бъде охладен (но не замразен) при температури, достатъчно ниски за да бъде сведена до минимум аутолизата. Аутопсията следва да се извърши във възможно най-кратък срок, обичайно в рамките на един или два дни. Следва да бъдат записани всички макроскопски патологични изменения за всяко животно, като се обърне особено внимание на всякакви изменения в дихателните пътища.

45. С оглед увеличаване на стойността за интерпретиране на изследването могат да бъдат разглеждани допълнителни изследвания, включени *a priori* по план, като например измерване на телото на белите дробове на преживелите плъхове и/или осигуряване, чрез микроскопско изследване на дихателните пътища, на доказателства за дразнене. Изследваните органи могат да включват и тези, които представят доказателство за макроскопска патология при животните, преживели 24 часа или повече, както и органите, за които е известно или се очаква да бъдат засегнати. Микроскопското изследване на целия респираторен тракт може да предостави полезна информация за изпитвани химикали, които реагират с вода, такива като киселини и хигроскопични изпитвани химикали.

#### ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

##### Данни

46. Следва да бъдат посочени индивидуални данни за животните относно тяхното телесно тегло и находките при аутопсията. Данните от клиничните наблюдения следва да бъдат обобщени в таблична форма, показваща за всяка от изпитваните групи броя на използваните животни, броя на животните, проявяващи специфични признаци за токсичност, броя на животните, намерени мъртви по време на изпитването или умъртвени по хуманни причини, времето на настъпване на смъртта на отделните животни, описание и изменение във времето на токсичните ефекти и обратимостта им, както и находките при аутопсията.

##### Доклад от изпитването

47. Докладът от изпитването по целесъобразност следва да включва следната информация:

##### *Изпитвани животни и отглеждане*

- описание на условията в клетките, включително: брой (или промяна в броя) на животните в една клетка, материал за постилане, температура и относителна влажност на околната среда, продължителност на излагане на светлина и идентифициране на хранителния режим,
- използван вид/порода и обосновка за използване за видове, различни от плъх,
- брой, възраст и пол на животните,
- метод на случаен подбор,
- подробна информация за качеството на храната и водата (включително тип на хранителния режим/източник, водоизточник),
- описание на всякакво кондициониране преди изпитването, включително хранителен режим, карантина и лечение на заболявания;

##### *Изпитван химикал*

- физична природа, чистота и, където е относимо, физични и химични свойства (включително изомеризация),
- идентификационни данни и номер съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси (CAS), ако са известни;

##### *Носител*

- обосновка за използването на носител и обосновка за избора на носителя (ако е различен от вода),
- данни за минали периоди или паралелни данни, доказващи че носителят не пречи на резултата от изследването;

##### *Инхалационна камера*

- описание на инхалационната камера, включително размери и обем,
- източник и описание на оборудването, използвано за експозицията на животните, както и за генерирането на атмосферата,
- оборудване за измерване на температурата, относителната влажност, размера на частиците и действителната концентрация,

- източник на въздух и обработка на доставяния/извличания въздух и система, използвана за кондициониране,
- използвани методи за калибриране на оборудването за гарантиране на хомогенна атмосфера за изпитване,
- разлика в налягането (положителна или отрицателна),
- отвори за експозиция за всяка камера (експозиция само през носа); местоположение на животните в системата (експозиция на цялото тяло),
- хомогенност/устойчивост във времето на атмосферата за изпитване,
- разположение на датчиците за температура и относителна влажност и пробовземане на атмосферата за изпитване в камерата,
- скорости на въздушния поток, скорост на въздушния поток при отвор за експозиция (експозиция само през носа) или брой животни на камера (експозиция на цялото тяло),
- информация за оборудването, използвано за измерване на кислород и въглероден диоксид, ако е приложимо,
- време, необходимо за достигане на уравновесяване на инхалационната камера ( $t_{95}$ ),
- брой изменения на обема на час,
- измервателни прибори (ако е приложимо);

#### *Данни за експозицията*

- обосновка за избора на целева концентрация в основното изследване,
- номинални концентрации (обща маса на изпитвания химикал, генерирана в инхалационната камера, разделена на преминалия през камерата обем въздух),
- действителни концентрации на изпитвания химикал, взети от зоната на дишане на животните; за смеси, които произвеждат хетерогенни физични форми (газове, пари, аерозоли), всяка от тези форми може да бъде анализирана отделно,
- всички концентрации във въздуха следва да се докладват в единици за масова концентрация (напр. mg/l, mg/m<sup>3</sup> и т.н.); единици за отношение на обем (напр. ppv, ppb и др.) също могат да бъдат докладвани в скоби,
- разпределение на частиците по размер, аеродинамичен диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD) и геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ), включително методите за изчисляването им. Отделните анализи на размерите на частиците следва да бъдат докладвани;

#### *Условия на изпитването*

- подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал, включително подробна информация за всякакви процедури, използвани за намаляване на размера на частиците на твърди материали или за приготвяне на разтвори на изпитвания химикал. В случаите, когато механични процеси може да са променили състава на изпитван химикал, следва да се включат резултатите от анализите за проверка на състава на изпитвания химикал,
- описание (за предпочитане включващо схема) на оборудването, използвано за генериране на атмосферата за изпитване и за експозиция на животните на атмосферата за изпитване,
- подробни данни за използвания метод за анализ на химикала и за валидирането на метода (включително и ефикасността на добива на изпитвания химикал от матрицата на пробата),
- обосновката за избора на концентрациите за изпитване;

*Резултати*

- таблично представяне на данните за температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата,
- таблично представяне на данните за номиналната и действителната концентрация в камерата,
- таблично представяне на данните за размера на частиците, включително аналитични данни за пробовземането, за разпределението на частиците по размери, и изчисления на MMAD и  $\sigma_g$ ,
- таблично представяне на данните за отговора и на равнището на концентрацията за всяко животно (т.е. животни, показващи признаци на токсичност, включително смъртност, природа, сила, време на настъпване и продължителност на ефектите),
- данни за индивидуалното телесно тегло на животните, събрани по време на изследването; дата и време на смъртта ако е преди насрочената евтаназия, изменение във времето от настъпването на признаци за токсичност и дали са били обратими за всяко животно,
- находки от аутопсията и хистопатологични находки за всяко животно, ако има такива,
- оценки за леталността (напр. LC<sub>50</sub>, LD<sub>01</sub>), включително 95 %-ен доверителен интервал и наклон на крива (ако се предоставят от метода за оценка),
- статистическо отношение, включително оценка за експонент n (протокол C × t). Следва да бъде предоставено наименованието на използвания статистически софтуер;

*Дискусия и интерпретиране на резултатите*

- особено внимание следва да се обърне на описанието на методите, използвани за спазване на критериите на настоящия метод за изпитване, например пределната концентрация, или размера на частиците,
- в контекста на цялостните констатации следва да бъде разгледан въпросът дали частиците могат да бъдат видшвани, особено ако не е било възможно спазването на критериите за размер на частиците,
- трябва да се даде обосновка, ако е имало необходимост от умъртвяване по хуманен начин на животни, изпитващи болка или показващи признаци на силен и продължителен дистрес, въз основа на критериите в Ръководството на ОИСП за хуманен край (8),
- ако изпитването по глава Б.52. от настоящото приложение (4) е било преустановено в полза на настоящия метод Б.2., следва да бъде предоставена обосновка,
- съгласуваността на методите, използвани за определяне на номиналните и действителните концентрации, както и отношението на действителната концентрация към номиналната концентрация, трябва да бъдат включени в общата оценка на изследването,
- следва да бъдат разгледани вероятната причина за смъртта и преобладаващият начин на действие (системно срещу локално).

**ПРЕПРАТКИ:**

- (1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals № 403, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 39, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (3) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетирването и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006 (ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1).
- (4) Глава Б.52. от настоящото приложение, остра инхалаторна токсичност — метод клас остра токсичност.

- (5) Глава Б.40. от настоящото приложение, In vitro кожна корозия: Транскутанно измерване на електрическото съпротивление (TER).
- (6) Глава Б.40А. от настоящото приложение, In vitro кожна корозия: Изпитване върху модел на човешка кожа.
- (7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals № 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.
- (10) Phalen RF (2009). *Inhalation Studies: Foundations and Techniques*. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- (11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.
- (12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278-290.
- (13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105-117.
- (14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65-71.
- (15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 104, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (16) Finney DJ (1977). *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Изпитван химикал:** всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

---

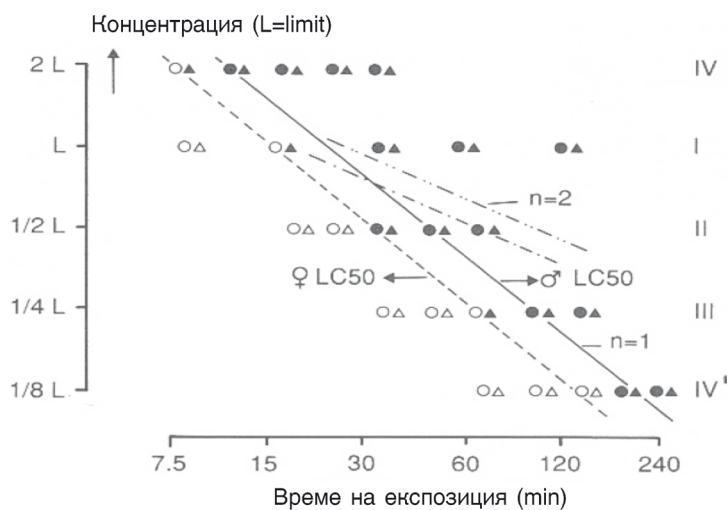
## Допълнение 1

Протокол  $C \times t$ 

1. Поетапното изследване  $C \times t$  може да бъде разглеждано като алтернатива на традиционния протокол при оценка на инхалаторната токсичност (12) (13) (14). То следва да се извършва преференциално когато е налице специфична регулаторна или научна необходимост, която изисква изпитване на животни с различна продължителност, като например за планиране на ответни действия при извънредни ситуации или за планиране на земеползването. Този подход обикновено започва с изпитване на пределна концентрация (сесия I на експозицията), при което животните са експонирани на изпитван химикал за пет продължителности (например 15, 30, 60, 120 и 240 минути), така че в рамките на една сесия на експозиция да се съдържат множество продължителности (вж. фигура 1). При прилагане на Регламент (ЕО) № 1272/2008 максималните пределни концентрации за газове, пари и аерозоли са съответно 20 000 ppm, 20 mg/l и 5 mg/l. Тези равнища могат да бъдат надвишавани само ако е налице регулаторна или научна необходимост от изпитване на тези равнища (вж. точка 37 в основния текст на Б.2).
2. При ситуации, при които има малко или няма информация за токсичността на изпитвания химикал, следва да бъде извършено зрительно изследване, при което групи от не повече от 3 животни от пол са експонирани на целеви концентрации, избрани от ръководителя на изследването, обичайно за 240 min.
3. Ако по време на сесия I от експозицията е извършено изпитване при дадена пределна концентрация и е наблюдавана смъртност под 50 %, не е необходимо допълнително изпитване. Ако е налице регулаторна или научна необходимост за установяване на взаимовръзка концентрация/време/отговор на равнища, по-високи от посочената пределна концентрация, следващата експозиция следва да се извършва на по-високо равнище, като например двукратно по-висока от пределната концентрация (т.е. 2 L на фигура 1).
4. Ако се наблюдава токсичност при пределната концентрация, необходимо е допълнително изпитване (основно изследване). Тези допълнителни експозиции се провеждат или при по-ниски концентрации (във фигура 1: сесии II, III или IV от експозицията) или при по-високи концентрации, като се използва по-кратка продължителност (във фигура 1: сесия IV от експозицията), като се използват продължителности, които са адаптирани и не са разположени на толкова голямо отстояние във времето една от друга.
5. Изпитването (първоначална концентрация и допълнителни концентрации) се извършва с използване на 1 животно от всеки пол за концентрация/времева точка, или с 2 животни от по-възприемчивия пол за концентрация/времева точка. При някои обстоятелства ръководителят на изследването може да избере да използва 2 пътя от всеки пол за концентрация/времева точка (или 4 животни от по-възприемчивия пол за концентрация/времева точка) (15). Използването на 2 животни от всеки пол за концентрация/времева точка обичайно намалява изместването и варирането на оценките, увеличава процента на събдяване на оценките и разширява доверителния интервал по отношение на описаният тук протокол. Повече подробна информация е предоставена в GD 39 (2).
6. В идеалния случай всяка сесия от експозицията се провежда в рамките на един ден. Това дава възможност за забавяне на следващата експозиция, докато се получи достатъчна увереност по отношение на преживяемостта, и позволява на ръководителя на изследването да адаптира целевата концентрация и продължителностите за следващата сесия от експозицията. Препоръчва се всяка сесия от експозицията да започва с групата, която ще бъде експонирана най-дълго, напр. групата, експонирана 240 минути, след това групата, експонирана 120 минути и т.н. Ако например животни от групата, експонирана 240 минути, умират след 90 минути или показват силни признаци на токсичност (например крайни промени в начина на дишане, като например задух), не би имало смисъл да бъде експонирана група в продължение на 120 минути, тъй като смъртността по всяка вероятност ще бъде 100 %. По този начин ръководителят на изследването трябва да избере по-кратки продължителности на експозицията за тази концентрация (т.е. 90, 65, 45, 33 и 25 минути).
7. Концентрацията в камерата трябва да се измерва често за определяне на средно претеглена по време концентрация за всяка продължителност на експозицията. Когато е възможно, времето на смъртта на всяко животно (а не продължителността на експозицията) следва да се използва в статистическия анализ.
8. Резултатите от първите четири сесии от експозицията следва да бъдат изследвани, за да се определи евентуална липса на данни в кривата на концентрацията във времето (вж. фигура 1). В случай на недостатъчно съответствие може да бъде извършена допълнителна експозиция (5-а концентрация). Концентрацията и продължителностите на експозицията за 5-ата експозиция следва да бъдат избрани така, че да запълнят тази липса.
9. Всички сесии от експозицията (включително първата сесия от експозицията) ще бъдат използвани за изчисляването на взаимовръзката концентрация/време/отговор с използването на статистически анализ (16). Ако е възможно, за всеки интервал  $C \times t$  следва да бъдат използвани средно претеглената във времето концентрация и продължителността на експозицията до настъпването на смъртта (ако смъртта настъпи по време на експозицията).

Фигура 1

Хипотетична илюстрация на взаимовръзката концентрация/време/смъртност при плъхове



Незапълнени символи = преживели; запълнени символи = умрели животни

Триъгълници = животни от женски пол; окръжности = животни от мъжки пол

Непрекъснатата линия = стойности на  $LC_{50}$  (обхват 7,5—240 min) за животни от мъжки пол с  $n = 1$

Прекъснатата линия = стойности на  $LC_{50}$  (обхват 7,5—240 min) за животни от женски пол с  $n = 1$

Пунктирани линии = хипотетични стойности за  $LC_{50}$  за животни от мъжки и женски пол, ако  $n$  беше равен на 2 (12).

Терминологичен справочник

Концентрация:

Време на експозиция:

10. По-долу е даден пример за поетапната процедура:

#### Сесия I от експозицията — Изпитване при пределната концентрация (вж. фигура 1)

- 1 животно от всеки пол за концентрация/времева точка; общо 10 животни <sup>(4)</sup>
- Целева концентрация <sup>(6)</sup>
- Експонират се пет групи животни на тази целева концентрация за продължителности съответно от 15, 30, 60, 120 и 240 минути.

↓

#### Сесия II от експозицията <sup>(8)</sup> — Основно изследване

- 1 животно от всеки пол за концентрация/времева точка; общо 10 животни.

<sup>(4)</sup> Ако не е налична информация, отнасяща се за възприемчивост полове, се използват плъхове от двата пола, т.е. по 1 животно от всеки пол за концентрация. Въз основа на съществуваща информация, или ако стане ясно по време на тази сесия от експозицията, че единият от половете е по-възприемчив, се използват 10 животни от по-възприемчивия пол (2 животни за концентрация/времева точка) за всяко равнище на концентрация по време на последователните изпитвания.

<sup>(6)</sup> При прилагане на Регламент (ЕО) № 1272/2008 максималните пределни концентрации за газове, пари и аерозоли са съответно 20 000 ppm, 20 mg/l и 5 mg/l. В случай на очаквана токсичност или въз основа на резултатите от зрителното изследване следва да бъдат избирани по-ниски начални концентрации. В случай на регулаторна или научна необходимост могат да бъдат използвани по-високи концентрации. = пределна концентрация.

<sup>(8)</sup> В идеалния случай експонирането на животните на следващото равнище на концентрация следва да бъде забавено, докато се получи достатъчна увереност за преживяемост на третираните преди това животни. Това позволява на ръководителя на изследването да адаптира целевата концентрация и продължителностите за следващата сесия от експозицията.



- Експонират се пет групи животни при по-ниска концентрация <sup>(†)</sup> ( $1/2 L$ , където  $L$  е пределната концентрация) с малко по-продължителни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно  $\sqrt{2}$ ; вж. фигура 1).

↓

#### Сесия III от експозицията — Основно изследване

- 1 животно от всеки пол за концентрация/времева точка; общо 10 животни.
- Експонират се пет групи животни при по-ниска концентрация <sup>(†)</sup> ( $1/4 L$ ) с малко по-продължителни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно  $\sqrt{2}$ ; вж. фигура 1).

↓

#### Сесия IV' от експозицията — Основно изследване

- 1 животно от всеки пол за концентрация/времева точка; общо 10 животни.
- Експонират се пет групи животни при по-ниска концентрация <sup>(†)</sup> ( $1/8 L$ ) с малко по-продължителни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно  $\sqrt{2}$ ; вж. фигура 1).

↓ или

#### Сесия IV от експозицията — Основно изследване

- 1 животно от всеки пол за концентрация/времева точка; общо 10 животни.
- Експонират се пет групи животни при по-висока концентрация <sup>(‡)</sup> ( $2 L$ ) с малко по-краткотрайни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно  $\sqrt{2}$ ; вж. фигура 1).

#### Математическа обработка на резултатите от протокол $C \times t$

- Процедура  $C \times t$  с 4 или 5 концентрации на експозиция и пет продължителности дава съответно 20 или 25 точки с данни. С тези точки с данни взаимовръзката  $C \times t$  може да бъде изчислена с използване на статистически анализ (16):

Уравнение 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

където  $C$  = концентрация;  $t$  = продължителност на експозицията, или

Уравнение 2:

$$\text{Отговор} = f(C^n t)$$

където  $n = b_1/b_2$ .

С помощта на уравнение 1 стойността на  $LC_{50}$  може да бъде изчислена за даден период от време (например 4 часа, 1 час, 30 минути или всякакъв друг период от време в рамките на диапазона на периодите от време на изпитване), при  $P = 5$  (50 % отговор). Отбележете, че правилото на Хабер се прилага само при  $n = 1$ . Стойността на  $LC_{01}$  може да бъде изчислена при  $P = 2,67$ .

<sup>(†)</sup> Минималната доза (концентрация  $\times$  време), която е довела до смъртност по време на изпитването при първоначална концентрация (първа сесия от експозицията) се взема като указание за установяване на следващата комбинация от концентрация и продължителности на експозицията. Обикновено концентрацията бива двукратно намалявана ( $1/2$  от  $L$ ) и животните се експонират в нов времеви обхват с по-фина стъпка с периоди на експозиция, разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно  $1,4 (\sqrt{2})$ ; вж. препратка 11) около времето съгласно равнището на минималната смъртоносна доза (време  $\times$  концентрация), наблюдавано през първата експозиция. В тази фигура (фигура 1) смъртността при сесия I от експозицията е установена за първи път на 15 мин.; продължителностите по време на сесия II следователно са разположени около 30 min и са 15, 21, 30, 42 и 60 минути. След първите две експозиции настоятелно се препоръчва данните да бъдат представени във фигура, подобна на представената по-горе, и да се провери дали кривата на взаимовръзката между концентрация и времето е под ъгъл 45 градуса ( $n = 1$ ) или ако взаимовръзката концентрация/време/отговор е с по-малък наклон (напр.  $n = 2$ ) или с по-голям такъв (напр.  $n = 0,8$ ). В последните случаи настоятелно се препоръчва следващите концентрации и продължителности да бъдат адаптирани по съответен начин.

<sup>(‡)</sup> В някои случаи може да е необходимо да се увеличи концентрацията ( $2$  пъти  $L$ ) за нов обхват от време с още по-фина стъпка с периоди на експозиция, разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно  $1,4 (\sqrt{2})$  около времето съгласно минималното смъртоносно равнище на концентрация, наблюдавано през първата експозиция. За предпочитане е минималната продължителност на експозицията да е над 5 минути; максималната продължителност на експозицията не следва да надвишава 8 часа."

4) Глави Б.7. и Б.8. се заменят със следното:

**„Б.7. 28-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ОРАЛНАТА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ГРИЗАЧИ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА**

**УВОД**

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 407 на ОИСП (2008 г.). Първоначалното Указание за изпитване 407 е прието през 1981 г. През 1995 г. е приета преразгледана версия, за получаване на допълнителна информация с източник използваното при изследването животно, по-специално относно невротоксичността и имунотоксичността.
2. През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите Указания за изпитване и по разработване на нови Указания за изпитване за скрининг и изпитвания за потенциални нарушения на функциите на ендокринната система (8). Един от елементите на дейността е да се актуализират съществуващите указания на ОИСП за „28-дневно изследване на оралната токсичност при гризачи с повтаряща се доза“ (TG 407) с параметри, подходящи за установяване на ендокринна активност на изпитваните химикали. Тази процедура премина през обширна международна програма за изпитване на относимостта и практическата приложимост на допълнителните параметри, на характеристиките на тези параметри за химикали с (анти)естрогенна, (анти)андрогенна и (анти)тиреоидна активност, на вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост, и на взаимодействието между новите параметри с параметрите, изисквани по предходното TG 407. Полученият при това голям обем данни е компилиран и му е извършена подробна оценка в широкообхватен доклад на ОИСП (9). Настоящият актуализиран метод за изпитване Б.7. (като равностоеен на TG 407) е крайният продукт от придобития опит и постигнатите резултати по време на международната програма за изпитване. Настоящият метод за изпитване позволява определени ендокринно медираните ефекти да бъдат поставени в един контекст с други токсикологични ефекти.

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ**

3. При извършването на оценка и изчисляването на токсичните характеристики на даден химикал определянето на оралната токсичност с повтарящи се дози може да се извърши след получаване, чрез изпитване за остра токсичност, на предварителна информация относно токсичността. Настоящият метод за изпитване има за цел да проучи последиците върху много широк спектър от потенциални прицелни обекти на токсичността. Той предоставя информация за възможните рискове за здравето, произтичащи по всяка вероятност от повтарящата се експозиция за относително кратък период от време, включително въздействие върху нервната, имунната и ендокринната системи. По отношение на тези конкретни крайни точки той следва да идентифицира химикали с невротоксичен потенциал, което може да даде основание за по-нататъшни по-задълбочени проучвания на този аспект, и химикали, които оказват въздействие върху физиологията на щитовидната жлеза. Той може също да осигури данни за химикали, които оказват влияние върху мъжките и/или женските репродуктивни органи при млади половозрепли животни и може да даде показания за имунологични ефекти.
4. Резултатите от настоящия метод за изпитване Б.7. следва да се използват за идентифициране на опасности и за оценка на риска. Резултатите, получени от свързаните с жлезите с вътрешна секреция параметри, следва да се разглеждат в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (11). Методът включва основното изследване на токсичността с повтарящи се дози, което може да се използва за химикали, при които 90-дневно изпитване не е оправдано (напр. когато производственият обем не надвишава определени граници) или като предварително проучване преди дългосрочно изследване. Продължителността на експозицията следва да е 28 дни.
5. Международната програма, изпълнена с оглед валидирането на параметри, които позволяват потенциално установяване на ендокринна активност на изпитван химикал, показва, че качеството на данните, получени чрез настоящия метод Б.7., зависят много от опита на лабораторията, извършила изследването. Това се отнася по-специално за хистопатологичното определяне на циклични промени в женските репродуктивни органи и за определянето на телгто на малките хормонално зависими органи, чиято дисекция е трудна. Разработени са указания относно хистопатологията (19). Те са на разположение на публичния уебсайт на ОИСП за указания за изпитване. Предназначени са да подпомагат патолозите при техните изследвания и да допринасят за повишаването на чувствителността на анализа. Бяха открити множество различни параметри, които са показатели за свързана с ендокринната система токсичност, и които бяха включени в метода за изпитване. Параметри, за които наличните данни бяха недостатъчни за доказване на полезност, или при които липсваха убедителни доказателства в програмата на валидиране на способността им за подпомагане откриването на нарушители на функциите на ендокринната система, се предлагат като незадължителни крайни точки (вж. допълнение 2).
6. Въз основа на данните, получени в процеса на валидиране, трябва да се подчертае, че чувствителността на този анализ не е достатъчна за да се идентифицират всички вещества с (анти)андрогенни или (анти)естрогенни начини на действие (9). Методът за изпитване не се извършва в жизнен стадий, който е най-чувствителен към нарушения на функциите на ендокринната система. Въпреки това по време на процеса на валидиране методът за изпитване идентифицира вещества, слабо и силно засягащи функцията на щитовидната жлеза, силно и умерено ендокринно активни вещества, действащи чрез естрогенни или андрогени рецептори, но в повечето случаи не е успял да идентифицира ендокринно активни вещества, които слабо засягат естрогенните или андрогени рецептори. Поради това той не може да бъде описан като скринингов анализ на ендокринна дейност.
7. Следователно, липсата на ефекти, свързани с тези начини на действие, не може да бъде приета като доказателство за липсата на ефект върху ендокринната система. Следователно по отношение на ендокринно медираните ефекти охарактеризирането на веществата не следва да се извършва въз основа единствено на резултатите от настоящия метод за изпитване, а да се използват в подход, основан на тежестта на доказателствата, включващ всички съществуващи данни за даден химикал за характеризиране на потенциална ендокринна активност. По тази причина вземането на регулаторни решения по отношение на ендокринната активност (охарактеризиране на вещества) следва да бъде подход, разчиташ на широка основа, а не само доверяващ се на резултатите от прилагането на настоящия метод за изпитване.

8. Възприето е всички процедури, свързани с животни, да съответстват на местните стандарти за грижи за животните; описанията на грижите и третирането, изложени по-долу, представляват минимални стандарти за изпълнение и се заменят от местните разпоредби, когато последните са по-строги. По-нататъшни указания за хуманното отношение към животните се дават от ОИСР (14).
9. Определенията са дадени в допълнение 1.

#### ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

10. Изпитваният химикал се прилага всекидневно през устата в постепенни дози към няколко групи от опитни животни, по едно ниво на доза за група за период от 28 дни. По време на периода на прилагане животните се наблюдават отблизо — всеки ден — за признаци на токсичност. Животните, които умират или са подложени на евтаназия по време на изпитването, се аутопсират, а при завършване на изпитването преживелите животни се подлагат на евтаназия и също се аутопсират. 28-дневното изследване предоставя информация относно въздействието от повтаряща се орална експозиция и може да покаже необходимост от допълнителни дългосрочни изследвания. То може да даде информация и за избора на концентрации за по-дългосрочни изследвания. Данните, получени при прилагане на метода за изпитване, следва да дават възможност за охарактеризиране на токсичността на изследвания химикал, за посочване на взаимовръзката между дозата и отговора, и за определяне на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL).

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Избор на животински вид

11. Плъховете са предпочитаният вид гризачи, въпреки че могат да се използват и други видове. Ако параметрите, определени в рамките на настоящия метод за изпитване Б.7., са изследвани при гризач от друг вид, следва да бъде дадена подробна обосновка. Въпреки че е приемливо от биологична гледна точка други видове да реагират на токсични вещества по начин, подобен на този при плъховете, използването на по-малки видове може да доведе до увеличено вариране поради техническите предизвикателства при дисекция на по-малки органи. В международната програма за валидиране за откриване на нарушители на функциите на ендокринната система плъхът е единственият използван вид. Следва да се използват здрави млади полово зрели животни от обичайно използваните за лабораторни изследвания породи. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. Дозирването следва да започва колкото е възможно по-скоро след отбиването на животното и при всички случаи преди то да е навършило девет седмици. При започване на изследването колебанията в теллото на използваните животни следва да бъдат минимални и да не превишават 20 % от средното за всеки пол телло. Ако изследване за повтаряща се орална доза се провежда като предварително проучване преди по-дългосрочно изследване, предпочита се и в двете изследвания да се използват животни от една и съща порода и източник.

##### Условия на отглеждане и хранене

12. Всички процедури трябва да са в съответствие с местните стандарти за полагане на грижи за лабораторни животни. Температурата в опитното помещение с животните трябва да бъде 22 °C ( $\pm 3$  °C). Въпреки че относителната влажност следва да бъде най-малко 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 %, освен по време на почистване на стаята, целта е относителната влажност да се поддържа в интервала 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване с изпитван химикал, когато прилагането му е по настоящия метод. Животните се настаняват групово, в малки групи от един и същи пол; животните могат да се настаняват отделно, ако това е научно обосновано. При групово настаняване в клетки не следва да има повече от пет животни в клетка.
13. Храната следва да бъде редовно анализирана за наличието на замърсители. Проба от хранителния режим трябва да се съхранява до окончателното изготвяне на доклада.

##### Подготовка на животните

14. Здрави млади полово зрели животни се определят на произволен принцип за контролните и опитните групи. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. На животните се дава уникална идентификация и се държат в техните клетки поне пет дни преди началото на изследването, за да се даде възможност за аклиматизиране към лабораторните условия.

##### Подготовка на дозите

15. Изпитваният химикал се прилага чрез хранене през сонда, чрез хранителния режим или чрез питейната вода. Начинът на прилагане през устата се определя в зависимост от целта на изследването и физичните/химичните/токсикокинетичните свойства на изпитвания химикал.
16. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това да се прецени за разтвор/емулсия в масло (напр. царевично олио), а след това — за разтваряне в други носители. За носители, различни от вода, следва да се познаят токсичните характеристики на носителя. Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носителя.

## ПРОЦЕДУРА

### Брой и пол на животните

17. За всяко ниво на доза следва да се използват най-малко 10 животни (пет женски и пет мъжки). Ако е планирана междувременна евтаназия на животни преди завършването на изследването, броят се увеличава с броя на животните, които е планирано да бъдат подложени на евтаназия преди завършването на изследването. Следва да се разгледа възможност за допълнителна сателитна група от 10 животни (по пет от двата пола) в контролната група и в групата с най-висока доза, за наблюдение на случаи на обратимост, персистиране или забавяне на токсичните ефекти, най-малко в продължение на 14 дни след третирането.

### Дозиране

18. Обикновено следва да се използват най-малко три опитни и една контролна групи, но ако от оценката на други данни се установи, че не се очакват ефекти при доза от 1 000 mg на kg телесно тегло на ден, може да бъде проведено изпитване при пределна концентрация. Ако няма достъпни подходящи данни, може да се проведе изследване за определяне на обхвата (с животни от същата порода и източник), което да подпомогне определянето на използваните дози. С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролна група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този, при животните от изпитвана група. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, контролната група трябва да получава най-голямото използвано количество носител.
19. Нивата на доза следва да се подбират, като се имат предвид всички достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него химикали. Целта при избор на най-високото ниво на доза е индуциране на токсични ефекти, но не смърт или силно страдание. След това следва да се подбират постепенно намаляващи нива на доза с оглед установяване на всеки един свързан с дозата отговор и на NOAEL. За определяне на последователно намаляващите нива на доза в повечето случаи е най-подходящо всяка доза да намалява два до четири пъти спрямо най-близката по-висока доза, а добавянето на допълнителна четвърта изпитвана група често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. намаление повече от 10 пъти).
20. В присъствието на наблюдавана обща токсичност (например намаляване на телесното тегло, ефекти върху черния дроб, сърцето, белите дробове, бъбреците и др.) или други промени, които може да не са токсични реакции (напр. редуциран хранителен прием, увеличен черен дроб), наблюдаваните въздействия върху имунни, неврологични и ендокринни чувствителни крайни точки следва да се интерпретират предпазливо.

### Изпитване при пределна концентрация

21. Ако изпитване при ниво на доза от поне 1 000 mg на kg телесно тегло дневно или — при прилагане с хранителен режим или с питейна вода — при еквивалентна концентрация в храната или питейната вода (основаваща се на определяне на телесното тегло), използвайки процедурите, описани за настоящото изследване, не предизвиква видими токсични ефекти и ако не се очаква токсичност, изхождайки от данните за структурно свързани химикали, то тогава може да не е необходимо пълно изследване с използване на три нива на доза. Изпитването при пределна концентрация се прилага, с изключение на случаи, при които експозиция на хора подсказва нуждата от използване на по-високо ниво на доза.

### Прием на дозите

22. Животните се дозират с изпитвания химикал ежедневно в продължение на 7 дни всяка седмица за период от 28 дни. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранене през сонда, това следва да става чрез еднократна доза за животното през стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Обемът не следва да превишава 1 ml на 100 g телесно тегло, освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори, при които могат да бъдат използвани 2 ml на 100 g телесно тегло. С изключение на дразнещи или корозивни химикали, при които обикновено се проявяват изострени ефекти при по-високи концентрации, варирането в изпитвания обем трябва да бъде минимизирано чрез регулиране на концентрацията с оглед осигуряване на постоянен обем при всички нива на доза.
23. За химикали, които се прилагат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството използван изследван химикал не въздейства върху нормалното хранене и водния баланс. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранителен режим, могат да бъдат използвани постоянна хранителна концентрация (ppm) или постоянно ниво на доза спрямо телесното тегло на животното; използваната алтернатива трябва да бъде посочена. За химикал, прилаган чрез хранене през сонда, дозата трябва да бъде давана приблизително по едно и също време всеки ден и да бъде регулирана при необходимост за поддържане на постоянно ниво на доза спрямо телесното тегло на животното. При използване на изследване с повтаряща се доза като предварително проучване преди дългосрочно изследване, следва да се използва подобен хранителен режим и в двете изследвания.

### Наблюдения

24. Периодът на наблюдение е 28 дни. Животните от сателитната група, определени за последващи наблюдения, следва да не бъдат третирани най-малко през следващите 14 дни, за да се открият късно появили се ефекти, или персистиране, или възстановяване от токсични ефекти.
25. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно, за предпочитане по едно и също време всеки ден и имайки предвид пиковия период за поява на очакваните ефекти след дозиране. Здравословното състояние на животните следва да се записва. Поне два пъти дневно всички животни се наблюдават за заболяемост и смъртност.

26. За всички животни следва да се провеждат подробни клинични наблюдения – веднъж преди първата експозиция (за да се даде възможност за интрасубектни сравнения) и най-малко веднъж седмично след това. Тези наблюдения следва да се извършват извън клетката на настаняване, на стандартна площадка, за предпочитане всеки път по едно и също време. Тези наблюдения следва да се описват внимателно, за предпочитане с използване на точкови системи, изрично определени от лабораторията, извършваща изпитвания. Следва да се положат усилия, за да се гарантира, че колебанията в условията на изпитването са минимални, както и че наблюденията се извършват за предпочитане от хора, неинформирани за изпитването. Отбелязваните признаци следва да включват, без да се ограничават до, промяна в кожата, козината, очите, лигавиците, поява на секречия и екскречия, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане). Следва да се записват също и изменения в походката, стойката и отговора при боравене, както и наличието на клонични или тонични движения, стереотипно (например прекомерно поддържане на външния вид, повтарящо се обикаляне в кръг) или необичайно поведение (например самоосакатяване, вървене назад) (2).
27. По време на четвъртата седмица на експозиция следва да се проведе оценка на сензорната реактивност към различни видове стимули (2) (напр. слухови, зрителни и проприоцептивни) (3)(4)(5), оценка на силата на захвата (6) и на двигателната активност (7). Допълнителна подробна информация по процедурите, които могат да бъдат следвани, е дадена в съответните препратки. Могат обаче да се използват и алтернативни процедури, различни от посочените в препратките.
28. Функционалните наблюдения, проведени по време на четвъртата седмица на експозиция, могат да бъдат пропуснати, ако изследването се извършва като предварително към последващо (90-дневно) изследване за субхронична токсичност. В този случай функционалните наблюдения следва да бъдат включени в това последващо изследване. От друга страна, наличието на данни от функционални наблюдения от изследването с повтарящи се дози могат да подобрят възможността за избор на нива на доза за последващо изследване за субхронична токсичност.
29. По изключение, функционалните наблюдения могат също да се избегнат за групи, които иначе показват признаци на токсичност в размер, който значително би попречил на извършването на функционалното изпитване.
30. При аутопсията като опция може да бъде определен естралният цикъл на всички животни от женски пол, чрез вземане на вагинални намазки. Тези наблюдения предоставят информация относно етапа на естралния цикъл при умъртвяването и допринасят за хистологичната оценка на тъкани, чувствителни към естроген [вж. указанията, отнасящи се за хистопатологията (19)].

#### **Телесно тегло и консумация на храна/вода**

31. Теглото на всички животни следва да се измерва поне един път в седмицата. Консумацията на храна се измерва най-малко един път седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, най-малко един път в седмицата се измерва и консумацията на вода.

#### **Хематология**

32. В края на периода на изпитването следва да се извършат следните хематологични изследвания: хематокрит, концентрации на хемоглобин, брой на еритроцитите, ретикулоцити, общ и диференциален брой на левкоцити, брой на тромбоцитите, както и измерване на времето на съсирване/потенциала за съсирване на кръвта. Други определяния, които следва да се извършат ако изпитваният химикал или неговите предполагаеми метаболити имат, или се предполага че имат, окислителни свойства, включват концентрация на метхемоглобин и телца на Heinz.
33. Кръвните проби следва да се вземат от избран обект непосредствено преди или като част от процедурата по умъртвяване на животните, като се съхраняват при подходящи условия. Животните следва да бъдат оставени гладни през нощта преди умъртвяването (1).

#### **Клинична биохимия**

34. Клинични биохимични изследвания за проучване на основните токсични ефекти върху тъканите, и по-специално върху бъбреците и черния дроб, следва да се извършват върху кръвни проби, получени от всички животни непосредствено преди или като част от процедурата за умъртвяване на животните (независимо от животните, намерени в терминално състояние и/или умъртвени преди прекратяването на изследването). Изследванията на плазма и серум следва да включват натрий, калий, глюкоза, общ холестерол, уреа, креатинин, общо белтъци и албумин, поне два ензима, показателни за хепатоцелуларни ефекти (като аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, алкална фосфатаза, гама-глутамилтранспептидаза и глутаматдехидрогеназа). Измерванията за допълнителни ензими (от чернодробен и друг произход) и билирубин могат да дадат полезна информация при определени обстоятелства.
35. По избор през последната седмица от изследването може да се направят следните изследвания на урината, като се използва събраният за определено време обем урина; външен вид, обем, осмолалност или относителна плътност, рН, белтъци, глюкоза и кръв/кръвни клетки.

(1) За редица измервания на серума и плазмата, и най-вече за глюкозата, се предпочита гладуване през нощта преди измерването. Основната причина за това предпочитание е, че нарасналата вариация, която неминуемо би последвала ако не се прилага гладуване, би могла да замаскира по-трудно половими ефекти и да затрудни интерпретирането. От друга страна обаче, гладуването през нощта може да въздейства върху общия метаболизъм на животните, и по-специално при изследване на храненето може да наруши дневната експозиция на изследвания химикал. Ако се възприеме нощно гладуване, клиничните биохимични определяния следва да се извършат след провеждането на функционално наблюдение през седмица 4 от изследването.

36. Като допълнение следва да бъдат разгледани изследвания на плазмени и серумни маркери за основните увреждания на тъканите. Други определяния, които следва да се проведат, ако известните свойства на изпитвания химикал могат да повлияят или се предполага че влияят на свързаните метаболитни профили, са калций, фосфати, триглицериди, специфични хормони и холинестераза. Те следва да бъдат идентифицирани за химикалите от определени класове или въз основа на всеки отделен случай.
37. Въпреки че в международната оценка на свързаните с жлезите с вътрешна секреция крайни точки не са идентифицирани ясни предимства за определянето на тиреоидни хормони ( $T_3$ ,  $T_4$ ) и стимулиращ щитовидната жлеза хормон (TSH), може да бъде от полза да се съхраняват пробите от плазма или серум за измерване на  $T_3$ ,  $T_4$  и TSH (по избор) ако има показания за въздействие върху хипофизно-тиреоидната ос. Тези проби могат да бъдат замразени при  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  за съхранение. Следните фактори могат да повлияят на варирането и на абсолютните концентрации при определянето на хормони:
- времето на умъртвяване, поради дневните колебания в концентрацията на хормони
  - методът на умъртвяване, за да се избегне ненужен стрес за животните, който може да повлияе на концентрациите на хормони
  - комплектите за изпитване за определяне на хормони, които могат да се различават по стандартните си криви.
- Окончателната идентификация на тиреоидно активни химикали е по-надеждна чрез хистопатологичен анализ, отколкото чрез нива на хормони.
38. Пробите от плазма, специално предназначени за определяне на хормони, следва да бъдат получени в сравними периоди през деня. Препоръчва се да се разгледа възможността за определяне на  $T_3$ ,  $T_4$  и TSH, инициирано въз основа на изменения в тиреоидната хистопатология. Числовите стойности, получени при анализа на концентрации на хормони, се различават при употребата на различни търговски комплекти за анализ. Следователно, може да е невъзможно да се предоставят критерии за параметрите, основаващи се на единни данни за минали периоди. Като алтернатива, лабораториите следва да се стремят да запазят контролните коефициенти на вариация под 25 за  $T_3$  и  $T_4$  и под 35 за TSH. Всички концентрации следва да бъдат записвани в  $\text{ng/ml}$ .
39. Ако базовите данни за минали периоди са недостатъчни, следва да се разгледа възможност за определяне на хематологичните и клиничните биохимични променливи преди началото на дозирането или за предпочитане в набор от животни, които не са включени в опитните групи.

## ПАТОЛОГИЯ

### Макроскопска аутопсия

40. Всички животни, подложени на изследване, са обект на цялостна, подробна макроскопска аутопсия, която включва внимателно изследване на външната повърхност на тялото, всички отвори и черепната, гръдната и коремната кухини и тяхното съдържание. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези, тестисите, епидидимите, простатата + семенните мехурчета с коагулиращите жлези като цяло, тимусът, далакът, мозъкът и сърцето на всички животни (независимо от животните, намерени в терминално състояние и/или умъртвени преди прекратяването на изследването) следва да се почистят от поленалите по тях тъкани, когато е целесъобразно, и след дисекцията колкото е възможно по-скоро да се измери тяхното мокро тегло, за да се избегне изсъхване. Трябва да се внимава при почистване на простатата и семенните мехурчета с коагулиращите жлези, за да се избегне пункция на изпълнените с течност семенни мехурчета. Като алтернатива, семенните мехурчета и простатата могат да бъдат почистени и претеглени след фиксирането.
41. В допълнение, две други тъкани могат като опция да бъдат претеглени възможно най-скоро след дисекцията, за да се избегне изсъхването: двойката яйчници (мочно тегло) и матката, включително шийката (указания за отстраняване и подготовка на маточните тъкани за измерване на теглото се предоставят в ОИСП TG 440 (18).
42. Теглото на щитовидната жлеза (като опция) би могло да се определи след фиксирането. Почистването също следва да се осъществи много внимателно и само след фиксиране, за да се избегне увреждане на тъканите. Увреждането на тъканите може да постави под съмнение хистопатологичния анализ.
43. Следните тъкани следва да бъдат консервирани в среда за фиксиране, най-подходяща както за вида тъкан, така и за очакваното последващо хистопатологично изследване (вж. точка 47): всички макроскопски увреждания, мозък (представителните области, включително главния мозък, малкия мозък и моста), гръбначен мозък, очи, стомах, тънко и дебело черво (включително Пайеровите плаки), черен дроб, бъбреци, надбъбречни жлези, далак, сърце, тимус, щитовидна жлеза, трахея и бели дробове (консервирани чрез инфлация с фиксатор и последващо потапяне), полови жлези (тестиси и яйчници), допълнителни полови органи (матка и шийка, епидидими, простата + семенни мехурчета с коагулиращите жлези), влагалище, пикочен мехур, лимфни възли [освен разположеният най-близо до средата на тялото дренаж възел следва да бъде взет още един лимфен възел в съответствие с опита на лабораторията (15)], периферен нерв (сепалишен или голямопищялен), за предпочитане в непосредствена близост до мускула, скелетен мускул и кост с костен мозък (срез от костен мозък или, като алтернатива, костномозъчен аспират, прясно фиксиран). Препоръчва се тестисите да бъдат фиксирани чрез потапяне във фиксатор на Bouin или модифициран фиксатор на Davidson (16) (17). Tunica albuginea трябва да бъде леко пробита на неголяма дълбочина в двата края на органа с игла, за да се позволи бързото проникване на фиксатора. Клиничните и другите находки могат да посочат необходимостта от изследвания на допълнителни тъкани. Също така всички органи, които на основата на познатите свойства на изпитвания химикал се считат за вероятни прицелни органи, следва да бъдат консервирани.

44. Следните тъкани могат да предоставят ценни показания за свързани с ендокринната система последици: Полови жлези (яйчници и тестиси), допълнителни полови органи (матка, включително шийка, епидидими, семенни мехурчета с коагулиращите жлези, локализирана дорзолатерално и вентрално простата), влагалище, хипофиза, мъжка млечна жлеза, щитовидна жлеза и надбъбречна жлеза. Измененията в мъжките млечни жлези не са достатъчно документирани, но този параметър може да бъде много чувствителен към вещества с естрогенно действие. Наблюдението на органи/тъкани, които не са изброени в точка 43, е като опция (вж. допълнение 2).
45. В Указанията за хистопатология (19) се съдържа допълнителна подробна информация относно дисекцията, фиксирането, разрязването и хистопатологията на ендокринните тъкани.
46. В международната програма за изпитване са получени някои доказателства, че едва доловими ендокринни ефекти от химикали с нисък потенциал за засягане хомеостазата на половите хормони могат да бъдат определяни от смущения в синхронизирането на естралния цикъл в различни тъкани, а не толкова от явни хистопатологични изменения в женските полови органи. Въпреки че не е получено окончателно доказателство за такива въздействия, препоръчва се доказателствата за евентуална асинхронност на естралния цикъл да бъдат вземани под внимание при интерпретиране на хистопатологията на яйчниците (фоликулни, тека и гранулозни клетки), матката, шийката на матката и влагалището. Ако се прави оценка на етапа от цикъла, както е определен с вагинални намазки, той също би могъл да бъде включен в това сравнение.

#### **Хистопатология**

47. На консервираните органи и тъкани на всички животни от контролните групи и групите с висока доза следва да бъде извършена пълна хистопатология. Тези изследвания следва да се приложат и за животните от всички други групи, получили дозата, ако се наблюдават изменения в резултат от третирането на групата с висока доза.
48. Трябва да бъдат изследвани всички макроскопски увреждания.
49. Когато се използва сателитна група, хистопатология следва да се извършва на тъкани и органи, за които е установено че показват ефект при третираните групи.

#### **ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ**

##### **Данни**

50. Следва да бъдат осигурени индивидуални данни. Допълнително всички данни следва да се обобщат в таблична форма, показваща за всяка изпитвана група броя на животните при започване на изпитването, броя на животните, които са открити мъртви по време на изпитването или са били умъртвени по хуманни причини, и времето на смъртта или умъртвяването по хуманни причини, броя на животните с проявени признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето на започването, продължителността и силата на всички токсични въздействия, броя на животните с увреждания, типа на уврежданията, остротата им и процента на животните, показващи всеки отделен тип увреждане.
51. Когато е възможно, следва да се оценят получените числени резултати чрез използване на подходящ и общоприет статистически метод. Чрез сравнения на въздействието в рамките на даден обхват на дозиране следва да се избегне използването на множество t-изпитвания. Статистическите методи следва да бъдат избрани при планирането на изследването.
52. За контрол на качеството се предлага да се събират контролни данни за минали периоди и да се изчисляват коефициенти на вариация за числовите данни, особено за параметрите, свързани с откриване на нарушители на функциите на ендокринната система. Тези данни могат да бъдат използвани за сравнение когато се извършва оценка на актуалните изследвания.

##### **Доклад от изпитването**

53. Докладът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

###### *Изпитван химикал:*

- физическа природа, чистота и физични и химични свойства,
- данни за идентичността.

###### *Носител (когато се използва такъв):*

- обосновка за избора на носител, когато е различен от вода.

*Изпитвани животни:*

- използван вид/порода,
- брой, възраст и пол на животните,
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.,
- индивидуално телно на животните в началото на изпитването,
- обосновка при използване на видове, различни от плъх.

*Условия на изпитването:*

- обосновка за избора на нивото на доза,
- подробна информация за състав на изпитвания химикал/хранителната смес, постигната концентрация, стабилност и хомогенност на сместа,
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал,
- превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода (ppm) в действителна доза (mg на kg телесно телно дневно), ако е приложимо,
- подробна информация за качеството на храната и водата за пиене.

*Проучвани незадължителни крайни точки*

- списък на проучваните незадължителни крайни точки

*Резултати:*

- телесно телно/промени в телесното телно,
- ако е приложимо — консумация на храна и вода,
- данни относно отговор на токсичност в зависимост от пола и нивото на доза, включително признаци на токсичност,
- природа, сила и продължителност на клиничните наблюдения (независимо обратими или необратими),
- оценки на сензорната активност, силата на захвата и двигателната активност,
- хематологични изпитвания с относими базови стойности,
- клинични биохимични изпитвания с относими базови стойности,
- телесно телно при умъртвяване и данни за телното на отделните органи,
- находки при аутопсията,
- подробно описание на всички хистопатологични находки,
- данни за абсорбция, ако са налични,
- статистическа обработка на резултатите, ако е подходящо.

*Обсъждане на резултатите.**Заключения.*



## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Андрогенност** е способността на даден химикал да действа като естествен андрогенен хормон (напр. тестостерон) в организъм на бозайник.

**Антиандрогенност** е способността на даден химикал да потиска действието на естествен андрогенен хормон (напр. тестостерон) в организъм на бозайник.

**Антиестрогенност** е способността на даден химикал да потиска действието на естествен естрогенен хормон (напр. 17бета-естрадиол) в организъм на бозайник.

**Антитиреоидна активност** е способността на даден химикал да потиска действието на естествен тиреоиден хормон (напр. T<sub>3</sub>) в организъм на бозайник.

**Дозиране** е общо понятие, включващо дозата и честотата и продължителността на нейния прием.

**Доза** е прилаганото количество от изпитвания химикал. Дозата се изразява като маса на изпитвания химикал за единица телесно тегло на изпитваното животно на ден (напр. mg на kg телесно тегло дневно), или като постоянна концентрация в храната.

**Очевидна токсичност** е общо понятие, описващо ясни признаци на токсичност след прилагането на изпитван химикал. Те следва да бъдат достатъчни за оценка на опасността и следва да бъдат такива, че при увеличаване на прилаганата доза да се очаква развитие на признаци на силна токсичност и вероятна смърт.

**NOAEL** е съкращение за нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект. Това е най-високото ниво на доза, при което не се наблюдават свързани с третирането неблагоприятни находки в резултат от третирането.

**Естрогенност** е способността на даден химикал да действа като естествен естрогенен хормон (напр. 17бета-естрадиол) в организъм на бозайник.

**Изпитван химикал:** всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

**Тиреоидна активност** е способността на даден химикал да действа като естествен тиреоиден хормон (напр. T<sub>3</sub>) в организъм на бозайник.

**Валидиране** е научна процедура, планирана за характеризиране на работните изисквания и ограничения на даден метод за изпитване, и за доказване на неговата надеждност и относимост за определена цел.

## Допълнение 2

**Крайни точки, препоръчани за откриване на нарушители на функциите на ендокринната система при настоящия метод 6.7**

Задължителни крайни точки	Незадължителни крайни точки
Тегло	
<ul style="list-style-type: none"> <li>— Тестиси</li> <li>— Епидидими</li> <li>— Надбъбречни жлези</li> <li>— Простата + семенни мехурчета с коагулиращите жлези</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Яйчници</li> <li>— Матка, включително шийката</li> <li>— Щитовидна жлеза</li> </ul>
Хистопатология	
<ul style="list-style-type: none"> <li>— Полови жлези: <ul style="list-style-type: none"> <li>— тестиси и</li> <li>— яйчници</li> </ul> </li> <li>— Допълнителни полови органи: <ul style="list-style-type: none"> <li>— епидидими,</li> <li>— простата + семенни мехурчета с коагулиращите жлези</li> <li>— матка, включително шийката</li> </ul> </li> <li>— Надбъбречна жлеза</li> <li>— Щитовидна жлеза</li> <li>— Влагалище</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Вагинални намазки</li> <li>— Мъжки млечни жлези</li> <li>— Хипофиза</li> </ul>
Измерване на хормони	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Циркулиращи нива на T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub></li> <li>— Циркулиращи нива на TSH</li> </ul>

**ПРЕПАРАТКИ:**

- (1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- (2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document № 60
- (3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9: 691-704.
- (5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment № 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

- (10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment № 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. [http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr\\_2649\\_37407\\_2348794\\_1\\_1\\_1\\_37407,00.html](http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html)
- (12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment № 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.
- (16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (17) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.
- (18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals № 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- (19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

#### Б.8. СУБАКУТНА ИНХАЛАТОРНА ТОКСИЧНОСТ: 28-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ

##### РЕЗЮМЕ

Настоящият преработен метод за изпитване Б.8. е разработен, за да се характеризира напълно токсичността на изпитвани химикали по инхалаторен път вследствие на повтаряща се експозиция за ограничен период от време (28 дни), и да се осигурят данни за количествени оценки на риска при инхалация. Групи от най-малко 5 мъжки и 5 женски гризачи се експонират 6 часа на ден в продължение на 28 дни а) на изпитвания химикал на три или повече равнища на концентрация, б) на филтруван въздух (отрицателна контрола), и/или в) на носителя (контрол върху носителя). Животните обикновено се експонират 5 дни седмично, но експозиция за 7 дни в седмицата също е позволена. Винаги се изпитват мъжки и женски животни, но те могат да бъдат експонирани при различни равнища на концентрация, ако е известно, че единият пол е по-възприемчив на даден изпитван химикал. Настоящият метод дава възможност на ръководителя на изследването да включва сателитни (за обратимост) групи, бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ), неврологични изпитвания и допълнителна клинична патология и хистопатологични оценки за по-добро характеризирание на токсичността на даден изпитван химикал.

##### УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 412 на ОИСП (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване за субакутна инхалаторна токсичност № 412 (TG 412) е прието през 1981 година (1). Настоящият метод Б.8. (като равностоеен на преразгледаното TG 412) е актуализиран, така че да отразява състоянието на науката и с оглед посрещане на настоящите и бъдещи регулаторни нужди.
2. Настоящият метод дава възможност за характеризирание на неблагоприятни ефекти вследствие на повтаряща се експозиция чрез инхалация на изпитван химикал в продължение на 28 дни. Данните, получени при 28-дневното изследване за субакутна инхалаторна токсичност, могат да се използват за количествена оценка на риска [ако не бъдат последвани от 90-дневно изследване за субхронична инхалаторна токсичност (глава Б.29 от настоящото приложение)]. Данните могат също да предоставят информация за избора на концентрации за по-продължителни изследвания, като например 90-дневно изследване за субхронична инхалаторна токсичност. Настоящият метод за изпитване не е специално предназначен за изпитване на наноматериали. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в края на тази глава и в GD 39 (2).

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

3. Цялата налична информация за изпитвания химикал следва да бъде разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждане на изследването с цел повишаване качеството на изследването и свеждане до минимум на използването на животни. Информация, която ще допринесе за избор на подходящи концентрации на изпитване, може да включва данни за идентификация, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; резултати от всякакви изпитвания за токсичност, извършени *in vitro* или *in vivo*; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност и токсикологични данни за вещества със сходна структура; и данни, получени от изпитвания за остра инхалаторна токсичност. Ако в хода на изследването се очаква или се наблюдава невротоксичност, ръководителят на изследването може да предпочете да включи подходящи оценки като например батерия от функционални изпитвания (FOB) и измерване на двигателната активност. Въпреки че по отношение на специфични изследвания моментът на експозициите може да бъде от решаващо значение, изпълнението на тези допълнителни дейности не следва да пречи на основния план на изследването.
4. Разредени разтвори на корозивни или дразнещи изпитвани химикали могат да се изпитват при концентрации, които ще доведат до желаната степен на токсичност [вж. GD 39 (2)]. При експозиция на животните на тези материали целевите концентрации трябва да са достатъчно ниски, за да не причиняват видима болка и дистрес, но също така да са достатъчни за да се разшири обхватът на кривата концентрация-отговор до равнища, при които се постигат регулаторната и научната цели на изпитването. Тези концентрации следва да бъдат подбрани въз основа на конкретен случай, за предпочитане въз основа на планирано по подходящ начин изследване за определяне на обхвата, предоставящо информация за критичната крайна точка, за всякакъв праг на дразнене и за времето на поява (вж. точки 11—13). Следва да се предостави обосновка за избора на концентрацията.
5. Умиращите животни, както и животните, които очевидно изпитват болка или показват признаци на силен и продължителен дистрес, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин. Умиращите животни се разглеждат по същия начин, както животните, умрели по време на изпитването. Критериите за вземане на решение за умъртвяване на умиращи или силно страдащи животни и указанията за разпознаване на предвидима или неизбежна смърт са предмет на Ръководство на ОИСР за хуманен край (3).

**ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Избор на животински вид**

6. Използват се здрави млади полово зрели гризачи от обичайно използваните за лабораторни изследвания породи. Предпочитаният вид е плъхът. Използването на други животински видове следва да бъде обосновано.

**Подготовка на животните**

7. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. В деня на подбора на случаен принцип животните следва да бъдат млади полово зрели индивиди на възраст от 7 до 9 седмици. Телесните телта следва да бъдат в рамките на  $\pm 20\%$  от средното телго за всеки пол. Животните се избират произволно, маркират се, за да е възможно индивидуалното им идентифициране, и се държат в техните клетки поне 5 дни преди започване на изпитването, за да се даде възможност за аклиматизиране към лабораторните условия.

**Отглеждане на животни**

8. Всяко животно се идентифицира индивидуално, по възможност с подкожни транспондери, за да се улеснят наблюденията и да се избегне объркване. Температурата на помещението, в което се отглеждат опитните животни, следва да бъде  $22 \pm 3$  °C. В идеалния случай относителната влажност следва да бъде поддържана в интервала от 30—70 %, макар че поддържането в този интервал може да не е възможно, когато се използва вода като носител. Преди и след експозициите животните обичайно следва да се поставят в клетките в групи по пол и концентрация, но броят на животните в дадена клетка не следва да възпрепятства точните наблюдения над всяко животно и следва да свежда до минимум загубите поради канибализъм и борба. За животни, при които експозицията е само през носа, може да е необходимо същите да бъдат аклиматизирани към ограничителните тръби. Ограничителните тръби не следва да причиняват ненужен стрес у животните поради физични, термични или причини, свързани с обездвижване. Ограничаването може да засегне физиологични крайни точки като телесната температура (хипертермия) и/или минутния дихателен обем. Ако са налични типови данни, които показват, че не настъпват такива осезаеми промени, тогава не е необходимо предварително адаптиране към ограничителните тръби. Животни, при които експозицията на аерозол е на цялото тяло, следва да се настаняват отделно по време на експозицията, за да се предотврати възможността животното да филтрува изпитвателния аерозол през козината на намиращи се в същата клетка други животни. Освен по време на експозицията, могат да се използват конвенционални и сертифицирани лабораторни храни, придружени с неограничено количество битова питейна вода. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина/12 часа тъмнина.

**Инхалационни камери**

9. При избора на инхалационна камера следва да бъдат разгледани естеството на изпитвания химикал и целта на изпитването. Предпочитаният начин на експозиция е само през носа (в този термин се включват експозиции само на главата, само през носа или само през муцуната). Експозицията само през носа обичайно се предпочита при изследване на течни и твърди аерозоли, както и на пари, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. Специалните цели на изследването могат да се постигнат по-добре чрез използване на режим на експозиция на цялото тяло, но това следва да бъде обосновано в доклада от изследването. За да се гарантира стабилност на атмосферата при използване на камера за експозиция на цялото тяло, общият „обем“ на изпитваните животни не трябва да превишава 5 % от обема на камерата. Принципиите на техниките за експозиция само през носа и за експозиция на цялото тяло и техните специфични предимства и недостатъци са описани в GD 39 (2).

## ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ТОКСИЧНОСТТА

**Пределни концентрации**

10. За разлика от изследванията за остра токсичност, при 28-дневното изследване за субакутна инхалаторна токсичност няма определени пределни концентрации. За максималната изпитвана концентрация следва да се вземе предвид: 1) максимално достижимата концентрация, 2) нивото на експозиция на човека при „най-лошия случай“ 3) необходимостта от поддържане на подходящо подаване на кислород, и/или 4) съображения, свързани с хуманното отношение към животните. При отсъствието на ограничения, основаващи се на данни, могат да бъдат използвани границите за остра токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (13) (т.е. до максимална концентрация от 5 mg/l за аерозоли, 20 mg/l за пари и 20 000 ppm за газове); вж. GD 39 (2). Трябва да се представи обосновка, ако е необходимо превишаване на тези граници при изпитване на газове или силно летливи изпитвани химикали (напр., хладилни агенти). Пределната концентрация трябва да води до токсичност по категоричен начин, без да причинява неоправдан стрес за животните и без да влияе на продължителността на живота им (3).

**Изследване за определяне на обхвата**

11. Преди началото на основното изследване може да бъде необходимо да се извърши изследване за определяне на обхвата. Изследването за определяне на обхвата е по-обширно от зрителното изследване, тъй като не е ограничено до избора на концентрация. Познанията, получени при изследването за определяне на обхвата, могат да доведат до успешно основно изследване. Изследването за определяне на обхвата може например да предостави техническа информация за дадено основно изследване по отношение на методите за анализ, определянето на размера на частиците, откриването на механизми на токсичност, данните от клиничната патология и хистопатологията и оценките на вероятните равнища на NOAEL и на максималната допустима концентрация. Ръководителят на изследването може да избере да използва изследването за определяне на обхвата за установяване на прага на дразнене на дихателните пътища (напр. с хистопатологично изследване на дихателните пътища, изпитване на белодробната функция или бронхоалвеоларен лаваж), на горната гранична стойност на концентрацията, която се понася без излишен стрес за животните, и на параметрите, които най-добре характеризират токсичността на даден изпитван химикал.
12. Изследването за определяне на обхвата може да включва едно или повече равнища на концентрация. Не повече от три животни от мъжки и три от женски пол трябва да бъдат експонирани на всяко равнище на концентрация. Изследването за определяне на обхвата трябва да продължи най-малко 5 дни и по принцип не повече от 14 дни. Обосновката за избора на концентрация за основното изследване следва да бъде предоставена в доклада от изследването. Целта на основното изследване е да покаже взаимовръзката концентрация-отговор въз основа на това, което се очаква да е най-чувствителната крайна точка. Ниската концентрация в идеалния случай е концентрация без наблюдаван неблагоприятен ефект, докато високата концентрация трябва да разкрива токсичност по категоричен начин, без да води до неоправдан стрес за животните и без да влияе на продължителността на живота им (3).
13. При избор на равнища на концентрация за изследването за определяне на обхвата цялата достъпна информация трябва да бъде разгледана, включително зависимостите структура-активност и данните за подобни химикали (вж. точки 3). Дадено изследване за определяне на обхвата може да потвърди/отхвърли считаните за най-чувствителни механизнично определени крайни точки, напр. подтискане на холинестеразата от органофосфати, образуване на метхемоглобин от еритроцитотоксични агенти, тиреоидни хормони (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>) за тиреотоксиканти, белтъци, лактатдеhidрогеназа или неутрофили в бронхоалвеоларен лаваж за безвредни малко разтворими частици или аерозоли с дразнещо действие върху белите дробове.

**Основно изследване**

14. Основното изследване за субакутна токсичност обичайно включва три равнища на концентрация, а също и паралелни отрицателни (въздух) контроли и/или контроли на носителя, ако е необходимо (вж. точки 17). Всички налични данни следва да бъдат използвани за подпомагане на избора на подходящи нива на експозиция, включително резултатите от изследванията за систематична токсичност, на метаболизма и на кинетиката (следва да се обърне специално внимание на избягване на високите равнища на концентрация, които насищат кинетичните процеси). Всяка изпитвана група се състои от най-малко 10 гризачи (5 мъжки и 5 женски), които се експонират на изпитвания химикал в продължение на 6 часа всеки ден 5 дни в седмицата за срок от 4 седмици (обща продължителност на изследването 28 дни). Животните могат да бъдат експонирани 7 дни в седмицата (напр. при изпитване на инхалирани фармацевтични продукти). Ако е известно, че единият от половете е по-възприемчив към даден изпитван химикал, двата пола могат да бъдат експонирани на различни равнища на концентрация, за да се оптимизира отношението концентрация-отговор, както е описано в точки 15. Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Трябва да бъде предоставена обосновка при използване на продължителност на експозицията по-малка от 6 часа дневно, или когато е необходимо да се проведе изследване с експозиция на цялото тяло с голяма продължителност (например 22 часа/ден) [вж. GD 39 (2)]. Храна не следва да се предоставя по време на периода на експозиция, освен ако експозицията надвишава 6 часа. Вода може да се дава по време на експозиция на цялото тяло.
15. При подобрите целеви концентрации следва да бъде идентифициран прицелният орган(и) и да се демонстрира ясно отношение концентрация-отговор:
- Високото равнище на концентрация трябва да води до токсични ефекти, но без да предизвиква трайни признаци или смъртност, които биха възпрепятствали съдържателната оценка.
  - Междинното(ите) равнище(а) на концентрация трябва да са разпределени така, че да се получи градация на токсичните ефекти между тези при ниска и тези при висока концентрация.
  - Ниското равнище на концентрация трябва да предизвиква малки или никакви признаци на токсичност.

**Изследване със сателитна група (за обратимост)**

16. Изследването със сателитна група (за обратимост) може да бъде използвано за наблюдение на случаи на обратимост, персистиране или забавяне на проявата на токсичността за достатъчно дълъг период след третирането, но не по-малък от 14 дни. Сателитните групи (за обратимост) се състоят от пет мъжки и пет женски животни, експонирани едновременно с опитните животни в основното изследване. Изследваните сателитни групи (за обратимост) следва да бъдат експонирани на изпитвания химикал при най-високото равнище на концентрация от изследвания химикал и следва да има паралелни контроли на въздуха и/или на носителя, ако е необходимо (вж. точки 17).

**Контролни животни**

17. Животните за паралелните негативни контроли (въздух) следва да се третират по същия начин, както и изпитваната група животни, с изключение на това, че те са изложени на филтруван въздух, а не на изпитвания химикал. Когато за подпомагане генерирането на атмосферата за изпитване се използва вода или друго вещество, в изследването трябва да се включи контролна група за носителя вместо група за паралелни негативни контроли (въздух). Когато това е възможно, като носител трябва да се използва вода. Когато водата се използва като носител, контролните животни трябва да бъдат експонирани на въздух със същата относителна влажност като експонираните групи. Изборът на подходящ носител следва да се базира върху подходящо проведено предварително проучване или върху данни за минали периоди. Ако носителът не е с добре позната токсичност, ръководителят на изследването може да реши да използва както негативни контроли (въздух), така и контроли за носителя, но това силно се обезкуражава. Ако данните за минали периоди показват, че даден носител не е токсичен, тогава няма необходимост от негативна контролна група (въздух), а следва да се използва само контрола за носителя. Ако при дадено предварително проучване на смесен с носител изпитван химикал не бъде установена токсичност, от това следва, че носителът не е токсичен при концентрацията на изпитване и следва да бъде използвана тази контрола за носителя.

**УСЛОВИЯ НА ЕКСПОЗИЦИЯ****Прилагане на концентрациите**

18. Животните се експонират на изпитвания химикал, който представлява газ, пари, аерозол или смес от тях. Агрегатното състояние, което трябва да бъде изпитано, зависи от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, избраната концентрация, и/или най-вероятната физична форма по време на манипулирането и употребата на изпитвания химикал. Хигроскопични и химически реактивоспособни изпитвани химикали следва да бъдат изпитвани в среда от сух въздух. Следва да се полагат грижи за избягване достигането на концентрации, при които може да бъде причинена експлозия. Частици от материал могат да бъдат подложени на механични процеси за намаляване на размера на частиците. Повече подробна информация е предоставена в GD 39 (2).

**Разпределение според размера на частиците**

19. Следва да бъде извършено определяне на размера на частиците за всички аерозоли и за парите, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. За да могат да бъдат експонирани всички относими части на дихателните пътища се препоръчват аерозоли с диаметър, равен на аеродинамичния диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD), намиращ се в диапазон от 1 до 3  $\mu\text{m}$  и с геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ) в диапазон от 1,5 до 3,0 (4). Въпреки че следва да се положи разумно усилие за спазване на този стандарт, ако това не може да бъде постигнато следва да бъде предоставена експертна оценка. Например размерите на частиците от метални пари могат да бъдат по-малки от този стандарт, а тези на заредени частици и влакна могат да надхвърлят този стандарт.

**Подготовка на изпитвания химикал в носител**

20. В идеалния случай изпитваният химикал трябва да бъде изпитван без носител. Ако е необходимо да се използва носител за генериране на подходяща концентрация и размер на частиците на изпитвания химикал, за предпочитане следва да се използва вода. Когато изпитваният химикал се разтваря в носител, следва неговата стабилност да бъде доказана.

**МОНИТОРИНГ НА УСЛОВИЯТА НА ЕКСПОЗИЦИЯ****Въздушен поток в камерата**

21. Въздушният поток през камерата за експозиция трябва да бъде внимателно контролиран, непрекъснато наблюдаван и записван най-малко на всеки час по време на всяка експозиция. Мониторингът в реално време на концентрацията на атмосферата за изпитване (или на стабилността във времето) представлява цялостно измерване на всички динамични параметри и предоставя непряко средство за контрол на всички относими динамични параметри, свързани с инхалацията. Ако се извършва мониторинг на концентрацията в реално време, честотата на измерването на въздушния поток може да бъде намалена до едно единствено измерване на експозиция дневно. Специално внимание следва да се обърне на избягване, при камери за експозиция само през носа, на повторно инхалиране. Концентрацията на кислород следва да бъде не по-малко от 19 %, а концентрацията на въглероден диоксид не трябва да превишава 1 %. Ако има основание да се смята, че тези стандарти не могат да бъдат спазени, концентрациите на кислорода и на въглеродния диоксид следва да се измерват. Ако измерванията в първия ден от експозицията показват, че тези газове са на подходящи равнища, допълнителни измервания не следва да са необходими.

**Температура и относителна влажност на камерата**

22. Температурата в камерата трябва да се поддържа на  $22 \pm 3$  °C. Относителната влажност в зоната на дишане на животните — както за експозиция само през носа, така и за експозиция на цялото тяло — трябва да бъде наблюдавана непрекъснато и записвана на всеки час по време на всяка експозиция, когато е възможно. Предпочита се относителната влажност да бъде поддържана в диапазона между 30 и 70 %, но това може или да се окаже непосиожимо (например при изпитване на смеси на основата на вода), или да не може да бъде измерено поради въздействие на изпитвания химикал върху метода за изпитване.

**Изпитван химикал: Номинална концентрация**

23. Когато е осъществимо, номиналната концентрация в камерата за експозиция следва да се изчислява и записва. Номиналната концентрация е масата на генерирания изпитван химикал, разделена на общия обем въздух, преминал през системата на инхалационната камера. Номиналната концентрация не се използва за характеризиране на експозицията на животните, а сравнение на номиналната концентрация и действителната концентрация дава показание за ефикасността на генериране на системата за изпитване и следователно може да се използва за откриване на проблеми при генерирането.

**Изпитван химикал: Действителна концентрация**

24. Действителната концентрация е концентрацията на изпитвания химикал в зоната на дишане на животните в дадена инхалационна камера. Действителни концентрации могат да бъдат получени чрез специфични методи (например чрез пряко пробовземане, свързани с адсорбция или с химична реакция методи и последващо аналитично охарактеризиране) или чрез неспецифични методи като гравиметричен анализ с филтруване. Използването на гравиметричен анализ е приемливо само за еднокомпонентни прахови аерозоли или за аерозоли от ниско летливи течности и следва да бъде подпомогнато от подходящо специфично за изпитвания химикал охарактеризиране чрез предварително изследване. Концентрацията на многокомпонентни прахови аерозоли също може да бъде определяна чрез гравиметричен анализ. Това обаче изисква аналитични данни, които доказват, че съставът на намиращия се във въздуха материал е подобен на този на изходния материал. Ако тази информация не е налична, може да е необходимо извършване на анализ на изпитвания химикал (в идеалния случай в състоянието, в което е разтворен във въздуха), повтарящо се на редовни интервали по време на изследването. За агенти в аерозолна форма, които могат да се изпаряват или да сублимират, следва да се покаже, че всички фази са събрани по избрания метод.
25. По възможност за времетраенето на изследването следва да се използва една партида от изпитвания химикал, като изпитваната проба следва да се съхранява при условия, при които се поддържат нейната чистота, хомогенност и устойчивост. Преди началото на изследването следва да се направи охарактеризиране на изпитвания химикал, включително неговата чистота и, ако е технически осъществимо, идентичността, както и количествата на определените замърсители и примеси. Това може да бъде доказано от, но не се ограничава до, следните данни: време на задържане и относителна площ на пика, получена чрез маспектрометрия или газова хроматография молекулярна маса, или други оценки. Въпреки че лабораторията, извършваща изпитвания, не носи отговорност за идентифицирането на пробата за изпитване, може да е разумно лабораторията, извършваща изпитвания, да потвърди охарактеризирането на финансиращия, дори и в ограничена степен (например цвят, физична природа и др.).
26. Атмосферата на експозицията трябва да бъде поддържана постоянна, доколкото е практически възможно. Могат да се използват устройства за мониторинг в реално време, като аерозолен фотометър (за аерозоли) или анализатор на общо съдържание на въглеродороди (за пари), за да се докаже стабилността на условията на експозиция. Действителната концентрация в камерата трябва да се измерва най-малко 3 пъти през всеки ден, в който се извършва експозиция, за всяко равнище на експозицията. Ако това не е осъществимо поради ограничена скорост на въздушния поток или поради ниска концентрация, допустимо е по едно пробовземане през всеки период на експозиция. В идеалния случай след това тази проба следва да бъде вземана през целия период на експозиция. Индивидуалните проби от концентрацията в камерата не трябва да се отклоняват от средната концентрация в камерата с повече от  $\pm 10\%$  за газовете и парите или  $\pm 20\%$  за течните или твърдите аерозоли. Времето за уравновесяване на камерата ( $t_{95}$ ) следва да се изчислява и докладва. Продължителността на експозицията обхваща времето за генериране на изпитвания химикал. Тук се взема под внимание времето за уравновесяване на камерата ( $t_{95}$ ) и за разпад. Указания за оценката на  $t_{95}$  могат да бъдат намерени в GD 39 (2).
27. При много сложни смеси, съставени от газове/пари и аерозоли (например атмосфера след горене и изпитвани химикали, отделяни от целеви продукти/оборудване за крайна употреба), всяка фаза може да реагира по различен начин в инхалационната камера. Следователно от всяка фаза (газ/пари и аерозол) следва да бъде избрано най-малко едно вещество (аналит), служещо като показател, като обичайно това е основното активно вещество в сместа. Когато изпитваният химикал е смес, аналитичната концентрация следва да се докладва за цялата смес, а не само за активната съставка или за веществото, служещо като показател (аналита). Допълнителна информация относно действителните концентрации може да бъде намерена в GD 39 (2).

**Изпитван химикал: Разпределение според размера на частиците**

28. Разпределението според размера на частиците на аерозоли трябва да се определя най-малко веднъж седмично за всяко равнище на концентрация, като се използва каскаден импактор или алтернативен инструмент, като например спектрометър за определяне на размера на аеродинамични частици. Ако може да бъде доказана равностойността на резултатите, получени от каскадни импактор и от алтернативния инструмент, тогава алтернативният инструмент може да бъде използван по време на цялото изследване.
29. Успоредно с основния инструмент следва да бъде използвано второ устройство, като например гравиметричен филтър или погълтател с въвеждаща тръбичка (импинджер)/барботиращ апарат, за да се потвърди ефикасността на пробовземането на основния инструмент. Масовата концентрация, получена чрез анализ на размера на частиците, следва да бъде в рамките на разумни граници от масовата концентрация, получена чрез филтруване [вж. GD 39 (2)]. В случай че тяхната равностойност може да бъде доказана при всички изпитвани концентрации в ранния етап на изследването, могат да не се извършват допълнителни измервания за потвърждение. От съображения за хуманно отношение към животните следва да се вземат мерки за свеждане до минимум на недостатъчните за формулиране на заключение данни, които могат да доведат до необходимост от повтаряне на дадено изследване.
30. Определяне на размера на частиците трябва да бъде направено за пари, ако съществува вероятност кондензация на парите да доведе до образуване на аерозол, или ако бъдат открити частици в атмосфера от пари с потенциал за смесени фази.

## НАБЛЮДЕНИЯ

31. Върху животните трябва да бъдат извършвани клинични наблюдения преди, по време на периода на експозиция и след него. Може да има показания за по-чести наблюдения в зависимост от отговора на животните по време на експозицията. Когато наблюдението на животните е възпрепятствано от използването на ограничителни тръби за животните, недостатъчно осветени камери за експозиция на цялото тяло, или непрозрачна атмосфера, животните следва да се наблюдават внимателно след експозицията. При наблюденията преди експозицията на следващия ден, може да се извърши оценка на всякаква обратимост или задълбочаване на токсичните ефекти.
32. Всички наблюдения се записват в поддържани за всяко животно индивидуални записи. Когато животните са умъртвени по хуманни причини или са намерени мъртви, времето на смъртта им следва да бъде записано колкото е възможно по-точно.
33. Наблюденията в клетките следва да включват изменения в кожата и козината, очите и лигавиците; изменения в дихателната и кръвоносната системи, изменения в нервната система, както и в соматомоторната активност и моделите на поведение. Вниманието следва да бъде насочено към наблюдения на треперене, конвулсии, слюноотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Измерването на ректалната температура може да предостави подкрепящи доказателства за рефлекторно забавено дишане или хипотермия/хипертермия, свързани с третирането или затвореното пространство. В протокола от изследването могат да бъдат включени допълнителни оценки, като кинетика, биомониторинг, функция на белите дробове, задържане на малко разтворими материали, които се натрупват в белодробната тъкан, и промени в поведението.

## ТЕЛЕСНО ТЕГЛО

34. Индивидуалното телесно тегло на животните следва да се записва непосредствено преди първата експозиция (ден 0), по два пъти на седмица след това (например: в понеделник и в петък, за доказване на възстановяване през уикенд, в който не е извършвана експозиция, или в даден времеви интервал, за да се даде възможност за оценяване на системната токсичност), и към момента на настъпване на смъртта или умъртвяването. Ако няма ефекти през първите 2 седмици, телесното тегло може да се измерва всяка седмица за останалото време от изследването. Измерването на теглото на животните от сателитните групи (за обратимост) (в случай на използване на такива) следва да продължава да се извършва веднъж седмично през целия период на възстановяване. При прекратяването на изследването всички животни следва да бъдат претеглени непосредствено преди умъртвяването, за да се даде възможност за изчисляване без изместване на съотношенията между теглото на органите и на цялото тяло.

## КОНСУМАЦИЯ НА ХРАНА И ВОДА

35. Консумацията на храна трябва да се измерва всяка седмица. Консумацията на вода също може да се измерва.

## КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ

36. Оценка за клиничната патология следва да бъдат правени за всички животни, включително тези в контролни и сателитни групи (за обратимост), когато те се умъртвяват. Интервалът от време между края на експозицията и вземането на кръв трябва да се записва, особено когато възстановяването на изследваната крайна точка е бързо. Има показания за вземане на проби след края на експозицията за параметрите с кратък плазмен полуживот (напр. СОНб, СНЕ и MetHb).
37. В таблица 1 са изброени параметрите на клиничната патология, които обичайно се изискват за всички токсикологични изследвания. Изследване на урина рутинно не е необходимо, но може да се извършва, ако се счита че е необходимо поради очаквана или наблюдавана токсичност. Ръководителят на изследването може да избере да оцени допълнителни параметри, за да охарактеризира по-добре токсичността на даден изпитван химикал (напр. холинестераза, липиди, хормони, киселинно-алкално равновесие, метхемоглобин или телца на Heinz, креатинкиназа, миелоидно-еритроидно съотношение, тропонин, газове в артериалната кръв, лактатдехидрогеназа, сорбитолдехидрогеназа, глутаматдехидрогеназа, и гама-глутамилтранспептидаза).

Таблица 1

## Стандартни параметри на клиничната патология

Хематология	
Брой на еритроцитите	Общ брой на левкоцитите
Хематокрит	Диференциален брой на левкоцити
Концентрация на хемоглобина	Брой на тромбоцитите
Средно съдържание на хемоглобин	Потенциал за съсирване (изберете едно от посочените):
Среден обем на еритроцитите	— Протромбиново време
Средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите	— Време за съсирване
Ретикулоцити	— Частично тромбопластиново време



Клинична химия	
Глюкоза (*)	Аланинаминотрансфераза
Общ холестерол	Аспартатаминотрансфераза
Триглицериди	Алкална фосфатаза
Азот в кръвна уреа	Калий
Общ билирубин	Натрий
Креатинин	Калций
Общо белтъци	Фосфор
Албумин	Хлорид
Глобулин	
Изследвания на урина (незадължителни)	
Външен вид (цвет и мътност)	Общо белтъци
Обем	Глюкоза
Относителна плътност или осмолалност	Кръв/кръвни клетки
pH	

(\*) Тъй като продължителен период на гладуване може да доведе до изместване при измерването на глюкозата за третираните животни в сравнение с контролните, ръководителят на изследването следва да определи дали е целесъобразно гладуването на животните. Ако се прилага период на гладуване, същият следва да бъде съобразен с използвания животински вид; за плъхове той може да бъде 16 h (гладуване през нощта). Определянето на глюкоза на гладно може да се извърши след гладуването през нощта през последната седмица на експозиция или след гладуването през нощта преди аутопсията (в последния случай — заедно с всички други параметри на клиничната патология).

38. Когато има доказателства, че долните дихателни пътища (т.е. алвеолите) са основното място на отлагане и задържане, тогава бронхоалвеоларният лаваж (BAL) може да бъде избраната техника за количествен анализ на хипотетичните параметри доза-ефект, с насочване към алвеолит, възпаление на белите дробове и фосфолипидоза. Това позволява измененията на зависимостта доза-отговор и измененията на изменението във времето на уврежданията на алвеолите да бъдат проучени по подходящ начин. Течността от BAL може да бъде анализирана за общ и диференциален брой левкоцити, общо белтъци и лактатдехидрогеназа. Други параметри, които могат да бъдат съобразени, са тези, които са показателни за лизозомни увреждания, фосфолипидоза, фиброза и възпаление, причинено от дразнене или от алергия, което може да включва определяне на провъзпалителни цитокини/хемокини. Измерванията на BAL по принцип допълват резултатите от хистопатологичните изследвания, но не могат да ги заместят. Насоки за това как да се извършва лаваж на белия дроб могат да бъдат намерени в GD 39 (2).

#### МАКРОСКОПСКА ПАТОЛОГИЯ И ТЕГЛО НА ОРГАНИ

39. Всички изпитвани животни, включително умрелите по време на изпитването или отстранени от изследването по причини, свързани с хуманното отношение към животните, следва да бъдат подложени на пълно обезкръвяване (ако е осъществимо) и на макроскопска аутопсия. Времето между края на експозицията на всяко животно и умъртвяването му следва да се записва. Ако аутопсията не може да се извърши веднага след откриването на мъртвото животно, трупуът на животното трябва да бъде охладен (но не замразен) при температури, достатъчно ниски за да бъде сведена до минимум автолизата. Аутопсията следва да се извърши във възможно най-кратък срок, обичайно в рамките на един или два дни. Следва да бъдат записани всички макроскопски патологични изменения за всяко животно, като се обърне особено внимание на всякакви изменения в дихателните пътища.
40. В таблица 2 се изброяват органите и тъканите, които трябва да бъдат консервирани в подходяща среда по време на макроскопската аутопсия за хистопатологично изследване. Консервирането на поставените в средни скоби в таблицата органи и тъкани и на всякакви други органи и тъкани е по преценка на ръководителя на изследването. Органите с **удебелен** шрифт следва да бъдат почистени и претеглени като мокро тегло колкото е възможно по-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването им. Щитовидната жлеза и епидидимите следва да бъдат претегляни само при необходимост, тъй като артефакти от почистването могат да възпрепятстват хистопатологичната оценка. Тъканите и органите следва да бъдат фиксирани в 10 % буферизиран формалинов разтвор или друг подходящ фиксатор веднага след извършването на аутопсията и не по-малко от 24 до 48 часа преди почистването в зависимост от използвания фиксатор.

Таблица 2

## Органи и тъкани, консервирани по време на макроскопската аутопсия

<b>Надбъбречни жлези</b>	Семенни мехурчета
Костен мозък (и/или прясно фиксиран аспирант)	Гръбначен мозък (шийно, гръдно и поясно ниво)
<b>Мозък</b> (включително срезове от главния мозък, малкия мозък и моста)	<b>Далак</b>
[Очи (ретина, оптичен нерв) и клепачи]	Стомах
<b>Сърце</b>	<b>Тестиси</b>
<b>Бъбреци</b>	<b>Тимус</b>
Ларинкс (3 равнища, 1 равнище следва да включва основата на епиглотиса)	Щитовидна жлеза
<b>Черен дроб</b>	Трахея (най-малко 2 равнища, включващи 1 Надлъжен срез през Хребетовидна структура и 1 напречен срез)
<b>Бял дроб</b> (всички лобове на едно равнище, включително главни бронхи)	[Пикочен мехур]
Лимфни възли от областта на хилуса на белия дроб, особено при малко разтворими изпитвани химикали под формата на частици — за по-задълбочени изследвания и/или изследвания с имунна насоченост могат да се вземат предвид допълнителни лимфни възли, например от медиастиналната, цервикалната/субмандибуларната и/или аурикуларната области.	Матка
Нософарингсни тъкани (най-малко 4 равнища; 1 равнище следва да включва нософарингския канал и назално асоциираната лимфоидна тъкан (NALT))	Всички макроскопски увреждания
Хранопровод	
[Обонятелна луковица]	
Яйчници	

41. Белите дробове следва да се отстранят невредими, да се претеглят и третирант с подходящ фиксатор при налягане от 20—30 cm воден стълб, за да се гарантира запазване на структурата им (5). Срезове следва да се събират за всички лобове на едно равнище, включително главните бронхи, но ако е извършен лаваж на белия дроб, следва да бъдат направени срезове на три равнища на лоба, на който не е извършен лаваж (не серийни срезове).
42. Най-малко 4 равнища на нософарингсните тъкани трябва да бъдат изследвани, едното от които следва да включва нософарингския канал (5, 6, 7, 8, 9), за да се даде възможност за адекватно изследване на плоския, преходния (респираторен без реснички), респираторния (респираторен с реснички) и обонятелния епители, и дрениращата лимфна тъкан (NALT; 10, 11). Три равнища на ларинкса трябва да бъдат изследвани, като едно от тези равнища следва да включва основата на епиглотиса (12). Най-малко две равнища на трахеята следва да бъдат изследвани, включително един надлъжен срез през хребетовидната структура на разклонението на извънбелодробните бронхи и един напречен срез.

## ХИСТОПАТОЛОГИЯ

43. Следва да бъде направена хистопатологична оценка на всички органи и тъкани, изброени в таблица 2, за контролната и експонираната на висока концентрация групи, и за всички животни, които са умрели или са умъртвени по време на изследването. Особено внимание следва да се обърне на дихателните пътища, прицелните органи и макроскопските увреждания. Органите и тъканите, които имат увреждания от групата, експонирана на висока концентрация, следва да бъдат изследвани във всички групи. Ръководителят на изследването може да избере да се извършат хистопатологични оценки за допълнителни групи, за да се докаже ясна взаимовръзка концентрация-отговор. Когато се използва сателитна група (за обратимост), хистопатологичната оценка следва да се извършва на всички тъкани и органи с показан ефект при третираните групи. Ако са налице прекомерен брой случаи на ранна смърт или други проблеми в групата, експонирана на висока концентрация, които застрашават значимостта на данните, следващата по-ниска концентрация следва да бъде хистопатологично изследвана. Трябва да се направи опит за съпоставяне на макроскопските наблюдения и микроскопските находки.

## ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

**Данни**

44. Следва да се предоставят индивидуалните данни за животните относно тяхното телесно тегло, консумация на храна, клинична патология, макроскопска патология, теглото на органите и хистопатология. Данните от клиничните наблюдения следва да бъдат обобщени в таблична форма, показваща за всяка от изпитваните групи броя на използваните животни, броя на животните, проявяващи специфични признаци за токсичност, броя на животните, намерени мъртви по време на изпитването или умъртвени по хуманни причини, времето на настъпване на смъртта на отделните животни, описание и изменение във времето на токсичните ефекти и обратимостта им, както и находките при аутопсията. Всички резултати, количествени и инцидентни, трябва да бъдат оценени с помощта на подходящ статистически метод. Може да се използва всеки общоприет статистически метод и статистическите методи следва да бъдат избрани при планирането на изследването.

**Доклад от изпитването**

45. Докладът от изпитването по целесъобразност следва да включва следната информация:

*Изпитвани животни и отглеждане*

- Описание на условията в клетките, включително: брой (или промяна в броя) на животните в една клетка, материал за постилане, температура и относителна влажност на околната среда, продължителност на излагане на светлина и идентифициране на хранителния режим.
- Използван вид/порода и обосновка за използване за видове, различни от плъх. Източник и данни за минали периоди могат да бъдат предоставени, ако са за животни, експонирани при сходни условия на експозиция, отглеждане и режим на гладуване.
- Брой, възраст и пол на животните.
- Метод на случаен подбор.
- Описание на всякакво кондициониране преди изпитването, включително хранителен режим, карантина и лечение на заболявания.

*Изпитван химикал*

- Физична форма, чистота и, където е подходящо, физични и химични свойства (включително изомеризация).
- Идентификационни данни и номер съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси (CAS), ако са известни.

*Носител*

- Обосновка за използването на носител и обосновка за избора на носителя (ако е различен от вода).
- Данни за минали периоди или паралелни данни, доказващи че носителят не пречи на резултата от изследването.

*Инхалационна камера*

- Подробно описание на инхалационната камера, включително обем и схема.
- Източник и описание на оборудването, използвано за експозицията на животните, както и за генерирането на атмосферата.
- Оборудване за измерване на температурата, относителната влажност, размера на частиците и действителната концентрация.
- Източник на въздух и система, използвана за кондициониране.
- Използвани методи за калибриране на оборудването за гарантиране на хомогенна атмосфера за изпитване.
- Разлика в налягането (положителна или отрицателна).
- Отвори за експозиция за всяка камера (експозиция само през носа); Местоположение на животните в камерата (експозиция на цялото тяло);

- Устойчивост на атмосферата за изпитване.
- Разположение на датчиците за температура и относителна влажност и пробовземане на атмосферата за изпитване в камерата.
- Обработка на доставяния/извличания въздух.
- Скорости на въздушния поток, скорост на въздушния поток при отвор за експозиция (експозиция само през носа) или брой животни на камера (експозиция на цялото тяло).
- Време за уравнивяване на инхалационната камера ( $t_{95}$ ).
- Брой изменения на обема на час.
- Измервателни прибори (ако е приложимо).

#### Данни за експозицията

- Обосновка за избора на целева концентрация в основното изследване.
- Номинални концентрации (обща маса на изпитвания химикал, генерирана в инхалационната камера, разделена на преминалия през камерата обем въздух).
- Действителни концентрации на изпитвания химикал, взети от зоната на дишане на животните; за смеси, които произвеждат хетерогенни физични форми (газове, пари, аерозоли), всяка от тези форми може да бъде анализирана отделно.
- Всички концентрации във въздуха следва да бъдат докладвани в единици масова концентрация ( $\text{mg/l}$ ,  $\text{mg/m}^3$  и т.н.), а не в единици за отношение на обем ( $\text{ppm}$ ,  $\text{ppb}$  и т.н.).
- Разпределение на частиците по размер, аеродинамичен диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD) и геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ), включително методите за изчисляването им. Отделните анализи на размерите на частиците следва да бъдат докладвани.

#### Условия на изпитването

- Подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал, включително подробна информация за всякакви процедури, използвани за намаляване на размера на частиците на твърди материали или за приготвяне на разтвори на изпитвания химикал.
- Описание (за предпочитане включващо схема) на оборудването, използвано за генериране на атмосферата за изпитване и за експозиция на животните на атмосферата за изпитване.
- Подробна информация за оборудването, използвано за наблюдение на температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата (т.е. разработване на калибрационна крива).
- Подробна информация за оборудването, използвано за пробовземане за определяне на концентрацията и разпределението на частиците по размери в камерата.
- Подробна информация за използвания метод за анализ на химикала и за валидирането на метода (включително и ефикасността на добива на изпитвания химикал от матрицата на пробата).
- Метод на случаен подбор при разпределяне на животните в изпитвани и контролни групи.
- Подробна информация за качеството на храната и водата (включително тип на хранителния режим/източник, водоизточник).
- Обосновката за избора на концентрациите за изпитване.

#### Резултати

- Таблично представяне на данните за температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата.
- Таблично представяне на данните за номиналната и действителната концентрация в камерата.

- Таблично представяне на данните за размера на частиците, включително аналитични данни за пробовземането, за разпределението на частиците по размери, и изчисления на MMAD и  $\sigma_g$ .
- Таблично представяне на данните за отговора и на равнището на концентрацията за всяко животно (т.е. животни, показващи признаци на токсичност, включително смъртност, природа, сила, време на настъпване и продължителност на ефектите).
- Таблично представяне на данните за индивидуалното телесно тегло.
- Таблично представяне на данните за консумацията на храна
- Таблично представяне на данните от клиничната патология
- Находки при аутопсията и хистопатологични находки за всяко животно, ако има такива.
- Таблично представяне на всякакви други измерени параметри

#### *Дискусия и интерпретиране на резултатите*

- Особено внимание следва да се обърне на описанието на методите, използвани за спазване на критериите на настоящия метод за изпитване, например пределната концентрация, или размера на частиците.
- В контекста на цялостните констатации следва да бъде разгледан въпросът дали частиците могат да бъдат вдишвани, особено ако не е било възможно спазването на критериите за размер на частиците.
- Съгласуваността на методите, използвани за определяне на номиналните и действителните концентрации, както и отношението на действителната концентрация към номиналната концентрация, трябва да бъдат включени в общата оценка на изследването.
- Следва да бъдат разгледани вероятната причина за смъртта и преобладаващият начин на действие (системно срещу локално).
- Трябва да се даде обосновка, ако е имало необходимост от умъртвяване по хуманен начин на животни, изпитващи болка или показващи признаци на силен и продължителен дистрес, въз основа на критериите в Ръководството на ОИСР за хуманен край (3).
- Трябва да бъде идентифициран прицелният орган(и).
- Трябва да бъдат определени нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) и най-ниската доза, при която се наблюдава неблагоприятен ефект (LOAEL).

#### **ПРЕПРАТКИ:**

- (1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline № 412, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.
  - (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
  - (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
  - (11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
  - (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
  - (13) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетирването и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006 (ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1).
-

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Изпитван химикал:** всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.“

5) Глави Б.29 и Б.30 се заменят със следното:

**„Б.29. СУБХРОНИЧНА ИНХАЛАТОРНА ТОКСИЧНОСТ: 90-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ**

## РЕЗЮМЕ

Настоящият преработен метод за изпитване Б.29. е разработен, за да се характеризира напълно токсичността на изпитвани химикали по инхалаторен път за субхронична продължителност (90 дни), и да се осигурят устойчиви данни за количествени оценки на риска при инхалация. Групи от 10 мъжки и 10 женски гризачи се експонират 6 часа на ден в продължение на 90 дни (13 седмици) а) на изпитвания химикал на три или повече равнища на концентрация, б) на филтруван въздух (отрицателна контрола), и/или в) на носителя (контрол върху носителя). Животните обикновено се експонират 5 дни седмично, но експозиция за 7 дни в седмицата също е позволена. Винаги се изпитват мъжки и женски животни, но те могат да бъдат експонирани при различни равнища на концентрация, ако е известно, че единият пол е по-възприемчив на даден изпитван химикал. Настоящият метод дава възможност на ръководителя на изследването да включва сателитни (за обратимост) групи, междинни умъртвявания, бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ), неврологични изпитвания и допълнителна клинична патология и хистопатологични оценки за по-добро характеризане на токсичността на даден изпитван химикал.

## УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 413 на ОИСП (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване за субхронична инхалаторна токсичност 413 (TG 413) е прието през 1981 година (1). Настоящият метод Б.29. (като равностоеен на преразгледаното TG 413 (2009)) е актуализиран, така че да отразява състоянието на науката и с оглед посрещане на настоящите и бъдещи регулаторни нужди.
2. Изследванията за субхронична инхалаторна токсичност се използват преди всичко за извеждане на регулаторни концентрации за оценка на риска за работниците при професионални занимания. Те също се използват за оценяване на риска за човека в жилището, в транспортния сектор и риска за околната среда. Настоящият метод дава възможност за характеризане на неблагоприятни ефекти вследствие на повтаряща се ежедневна експозиция чрез инхалация на изпитван химикал в продължение на 90 дни (приблизително 10 % от продължителността на живота на плъховете). Данните, получени от изследванията за субхронична инхалаторна токсичност, могат да се използват за количествена оценка на риска и за избор на концентрации за изследвания на хронична токсичност. Настоящият метод за изпитване не е специално предназначен за изпитване на наноматериали. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в края на тази глава и в Ръководство GD 39 (2).

## ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

3. Цялата налична информация за изпитвания химикал следва да бъде разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждане на изследването с цел повишаване качеството на изследването и свеждане до минимум на използването на животни. Информация, която ще допринесе за избор на подходящи концентрации на изпитване, може да включва данни за идентификацията, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; резултатите от всякакви изпитвания за токсичност, извършени *in vitro* или *in vivo*; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност и токсикологични данни за химикали със сходна структура; и данни, получени от други изследвания при повтаряща се експозиция. Ако в хода на изследването се очаква или се наблюдава невротоксичност, ръководителят на изследването може да предпочете да включи подходящи оценки като например батерия от функционални изпитвания (ФОВ) и измерване на двигателната активност. Въпреки че моментът на експозициите по отношение на специфични изследвания може да бъде от решаващо значение, изпълнението на тези допълнителни дейности не следва да пречи на основния план на изследването.
4. Разреждени разтвори на корозивни или дразнещи изпитвани химикали могат да се изпитват при концентрации, които ще доведат до желаната степен на токсичност. Моля вижте GD 39 (2) за допълнителна информация. При експониране на животни на тези материали целевите концентрации трябва да са достатъчно ниски, за да не причиняват видима болка и дистрес, но също така да са достатъчни за да се разшири обхватът на кривата концентрация-отговор до равнища, при които се постигат регулаторната и научната цели на изпитването. Тези концентрации следва да бъдат подбрани въз основа на конкретен случай, за предпочитане въз основа на планирано по подходящ начин изследване за определяне на обхвата, предоставящо информация за критичната крайна точка, за всякакъв праг на дразнене и за времето на поява (вж. точки 11—13). Следва да се предостави обосновка за избора на концентрацията.
5. Умиращите животни, както и животните, които очевидно изпитват болка или показват признаци на силен и продължителен дистрес, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин. Умиращите животни се разглеждат по същия начин, както животните, умрели по време на изпитването. Критериите за вземане на решение за умъртвяване на умиращи или силно страдащи животни и указанията за разпознаване на предвидима или неизбежна смърт са предмет на Ръководство на ОИСП за хуманен край (3).

## ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

### Избор на животински вид

6. Използват се здрави млади полово зрели гризачи от обичайно използваните за лабораторни изследвания породи. Предпочитаният вид е плъхът. Използването на други животински видове следва да бъде обосновано.

### Подготовка на животните

7. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. В деня на подбора на случаен принцип животните следва да бъдат млади полово зрели индивиди на възраст от 7 до 9 седмици. Телесните тегла следва да бъдат в рамките на  $\pm 20\%$  от средното тегло за всеки пол. Животните се избират произволно, маркират се, за да е възможно индивидуалното им идентифициране, и се държат в техните клетки поне 5 дни преди започване на изпитването, за да се даде възможност за аклиматизиране към лабораторните условия.

### Отглеждане на животни

8. Всяко животно се идентифицира отделно, по възможност с подкожни транспондери, за да се улеснят наблюденията и да се избегне объркване. Температурата на помещението, в което се отглеждат опитните животни, следва да бъде  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ . В идеалния случай относителната влажност следва да бъде поддържана в интервала от 30—70 %, макар че поддържането в този интервал може да не е възможно, когато се използва вода като носител. Преди и след експозициите животните обичайно следва да се поставят в клетките в групи по пол и концентрация, но броят на животните в дадена клетка не следва да възпрепятства точните наблюдения над всяко животно и следва да свежда до минимум загубите поради канибализъм и борба. За животни, при които експозицията е само през носа, може да е необходимо същите да бъдат аклиматизирани към ограничителните тръби. Ограничителните тръби не следва да причиняват ненужен стрес у животните поради физични, термични или причини, свързани с обездвижване. Ограничаването може да засегне физиологични крайни точки като телесната температура (хипертермия) и/или минутния дихателен обем. Ако са налични типови данни, които показват, че не настъпват такива осезаеми промени, тогава не е необходимо предварително адаптиране към ограничителните тръби. Животни, при които експозицията на аерозол е на цялото тяло, следва да се настаняват отделно по време на експозицията, за да се предотврати възможността животното да филтрува изпитвателния аерозол през козината на намиращи се в същата клетка други животни. Освен по време на експозицията, могат да се използват конвенционални и сертифицирани лабораторни храни, придружени с неограничено количество битова питейна вода. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина/12 часа тъмнина.

### Инхалационни камери

9. При избора на инхалационна камера следва да бъдат разгледани естеството на изпитвания химикал и целта на изпитването. Предпочитаният начин на експозиция е само през носа (в този термин се включват експозиции само на главата, само през носа или само през муцуната). Експозицията само през носа обичайно се предпочита при изследване на течни и твърди аерозоли, както и на пари, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. Специалните цели на изследването могат да се постигнат по-добре чрез използване на режим на експозиция на цялото тяло, но това следва да бъде обосновано в доклада от изследването. За да се гарантира стабилност на атмосферата при използване на камера за експозиция на цялото тяло, общият обем на изпитваните животни не трябва да надвишава 5 % от обема на камерата. Принципиите на техниките за експозиция само през носа и за експозиция на цялото тяло и техните специфични предимства и недостатъци са описани в GD 39 (2).

## ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ТОКСИЧНОСТТА

### Пределни концентрации

10. За разлика от изследванията за остра токсичност, при изследванията за субхронична инхалаторна токсичност няма определени пределни концентрации. За максималната изпитвана концентрация следва да се вземе предвид: 1) максимално достижимата концентрация, 2) нивото на експозиция на човека при „най-лошия случай“ 3) необходимостта от поддържане на подходящо подаване на кислород, и/или 4) съображения, свързани с хуманното отношение към животните. При отсъствието на ограничения, основаващи се на данни, могат да бъдат използвани границите за остра токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (13) (т.е. до максимална концентрация от 5 mg/l за аерозоли, 20 mg/l за пари и 20 000 ppm за газове); вж. GD 39 (2). Трябва да се представи обосновка, ако е необходимо превишаване на тези граници при изпитване на газове или силно летливи изпитвани химикали (напр. хладилни агенти). Пределната концентрация трябва да разкрива токсичност по категоричен начин, без да води до неоправдан стрес за животните и без да влияе на продължителността на живота им (3).

### Изследване за определяне на обхвата

11. Преди началото на основното изследване обичайно е необходимо да се извърши изследване за определяне на обхвата. Изследването за определяне на обхвата е по-обширно от зрителното изследване, тъй като не е ограничено до избора на концентрация. Познанията, получени при изследването за определяне на обхвата, могат да доведат до успешно основно изследване. Изследването за определяне на обхвата може например да предостави техническа информация за дадено основно изследване по отношение на методите за анализ, определянето на размера на частиците, откриването на механизми на токсичност, данните от клиничната патология и хистопатологията, и оценките на вероятните равнища на NOAEL и на максималната допустима концентрация. Ръководителят на изследването може да избере да използва изследването за определяне на обхвата за установяване на прага на дразнене на дихателните пътища (напр. с хистопатологично изследване на дихателните пътища, изпитване на белодробната функция или бронхоалвеоларен лаваж), на горната гранична стойност на концентрацията, която се понася без излишен стрес за животните, и на параметрите, които най-добре характеризират токсичността на даден изпитван химикал.



12. Изследването за определяне на обхвата може да включва едно или повече равнища на концентрация. В зависимост от избраните крайни точки, при всяко равнище на концентрация следва да бъдат експонирани три до шест мъжки и три до шест женски животни. Изследването за определяне на обхвата трябва да продължи най-малко 5 дни и по принцип не повече от 28 дни. Обосновката за избора на концентрации за основното изследване следва да бъде предоставена в доклада от изследването. Целта на основното изследване е да покаже взаимовръзката концентрация-отговор въз основа на това, което се очаква да е най-чувствителната крайна точка. Ниската концентрация в идеалния случай е концентрация без наблюдаван неблагоприятен ефект, докато високата концентрация трябва да разкрива токсичност по категоричен начин, без да води до неоправдан стрес за животните и без да влияе на продължителността на живота им (3).
13. При избор на равнища на концентрация за изследването за определяне на обхвата цялата достъпна информация трябва да бъде разгледана, включително зависимостите структура-активност и данните за подобни химикали (вж. точка 3). Дадено изследване за определяне на обхвата може да потвърди/отхвърли считаните за най-чувствителни механистично определени крайни точки, напр. потискане на холинестеразата от органични фосфати, образуване на метхемоглобин от еритроцитотоксични агенти, тиреоидни хормони ( $T_3$ ,  $T_4$ ) за тиреотоксиканти, белтъци, лактатдеhidrogenаза или неутрофили в бронхоалвеоларен лаваж за безвредни малко разтворими частици или аерозоли с празнещо действие върху белите дробове.

#### Основно изследване

14. Основното изследване за субхронична токсичност обичайно включва три равнища на концентрация, а също и паралелни отрицателни (въздух) контроли и/или контроли на носителя, ако е необходимо (вж. точки 18). Всички налични данни следва да бъдат използвани за подпомагане на избора на подходящи нива на експозиция, включително резултатите от изследванията за систематична токсичност, на метаболизма и на кинетиката (следва да се обърне специално внимание на избягване на високите равнища на концентрация, които насищат кинетичните процеси). Всяка изпитвана група се състои от 10 мъжки и 10 женски гризачи, които се експонират на изпитвания химикал в продължение на 6 часа всеки ден 5 дни в седмицата за срок от 13 седмици (обща продължителност на изследването най-малко 90 дни). Животните могат да бъдат експонирани 7 дни в седмицата (напр. при изпитване на инхалирани фармацевтични продукти). Ако е известно, че единият от половете е по-възприемчив към даден изпитван химикал, двата пола могат да бъдат експонирани на различни равнища на концентрация, за да се оптимизира отношението концентрация-отговор, както е описано в точки 15. Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Трябва да бъде предоставена обосновка при използване на продължителност на експозицията по-малка от 6 часа дневно, или когато е необходимо да се проведе изследване с експозиция на цялото тяло с голяма продължителност (например 22 часа/ден) (вж. GD 39) (2). Храна не следва да се предоставя по време на периода на експозиция, освен ако експозицията надвишава 6 часа. Вода може да се дава по време на експозиция на цялото тяло.
15. При подобрите целеви концентрации следва да бъде идентифициран прицелният орган(и) и да се демонстрира ясно отношение концентрация-отговор:
- Високото равнище на концентрация трябва да води до токсични ефекти, но без да предизвиква трайни признаци или смъртност, които биха възпрепятствали съдържателната оценка.
  - Междинните равнища на концентрация трябва да са разпределени така, че да се получи градация на токсичните ефекти между тези при ниска и тези при висока концентрация.
  - Ниското равнище на концентрация трябва да предизвиква малки или никакви признаци на токсичност.

#### Междинни умъртвявания

16. Ако се планират междинни умъртвявания, броят на животните при всяка експозиция трябва да бъде увеличен с планираните за умъртвяване преди приключване на изследването брой животни. Следва да се предостави обосновка за използването на междинни умъртвявания и същите следва да бъдат отчитани по подходящ начин от статистическите анализи.

#### Изследване със сателитна група (за обратимост)

17. Изследването със сателитна група (за обратимост) може да бъде използвано за наблюдение на случаи на обратимост, персистиране или забавяне на проявата на токсичността за достатъчно дълъг период след третирането, но не по-малък от 14 дни. Сателитните групи (за изследване на обратимостта) се състоят от 10 мъжки и 10 женски животни, експонирани едновременно с опитните животни в основното изследване. Изследваните сателитни групи (за изследване на обратимостта) следва да бъдат експонирани на изпитвания химикал при най-високото равнище на концентрация от изследвания химикал и следва да има паралелни контроли на въздуха и/или на носителя, ако е необходимо (вж. точки 18).

#### Контролни животни

18. Животните за паралелните негативни контроли (въздух) следва да се третират по същия начин, както и изпитваната група животни, с изключение на това, че те са изложени на филтруван въздух, а не на изпитвания химикал. Когато за подпомагане генерирането на атмосферата за изпитване се използва вода или друго вещество, в изследването трябва да се включи контролна група за носителя вместо група за паралелни негативни контроли (въздух). Когато това е възможно, като носител трябва да се използва вода. Когато водата се използва като

носител, контролните животни трябва да бъдат експонирани на въздух със същата относителна влажност като експонираните групи. Изборът на подходящ носител следва да се базира върху подходящо проведено предварително проучване или върху данни за минали периоди. Ако носителят не е с добре позната токсичност, ръководителят на изследването може да реши да използва както негативни контроли (въздух), така и контроли за носител, но това силно се обезкуражава. Ако данните за минали периоди показват, че даден носител не е токсичен, тогава няма необходимост от негативна контролна група (въздух), а следва да се използва само контрол на носител. Ако при дадено предварително проучване на смесен с носител изпитван химикал не бъде установена токсичност, от това следва, че носителят не е токсичен при концентрацията на изпитване и следва да бъде използвана тази контрола за носител.

#### УСЛОВИЯ НА ЕКСПОЗИЦИЯ

##### Прилагане на концентрациите

19. Животните се експонират на изпитвания химикал, който представлява газ, пари, аерозол или смес от тях. Агрегатното състояние, което трябва да бъде изпитано, зависи от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, избраната концентрация, и/или най-вероятната физична форма по време на манипулирането и употребата на изпитвания химикал. Хигроскопични и химически реактивоспособни изпитвани химикали следва да бъдат изпитвани в среда от сух въздух. Следва да се полагат грижи за избягване достигането на концентрации, при които може да бъде причинена експлозия. Частици от материал могат да бъдат подложени на механични процеси за намаляване на размера на частиците. Повече подробна информация е предоставена в GD 39 (2).

##### Разпределение според размера на частиците

20. Следва да бъде извършено определяне на размера на частиците за всички аерозоли и за парите, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. За да могат да бъдат експонирани всички относими части на дихателните пътища се препоръчват аерозоли с диаметър, равен на аеродинамичния диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD), намиращ се в диапазон от 1 до 3  $\mu\text{m}$  и с геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ) в диапазон от 1,5 до 3,0 (4). Въпреки че следва да се положи разумно усилие за спазване на този стандарт, ако това не може да бъде постигнато следва да бъде предоставена експертна оценка. Например размерите на частиците при метални пари могат да бъдат по-малки от този стандарт, а тези на заредени частици и влакна могат да надхвърлят този стандарт.

##### Подготовка на изпитвания химикал в носител

21. В идеалния случай изпитваният химикал трябва да бъде изпитван без носител. Ако е необходимо да се използва носител за генериране на подходяща концентрация и размер на частиците на изпитвания химикал, за предпочитане следва да се използва вода. Когато изпитваният химикал се разтваря в носител, следва неговата стабилност да бъде доказана.

#### МОНИТОРИНГ НА УСЛОВИЯТА НА ЕКСПОЗИЦИЯ

##### Въздушен поток в камерата

22. Въздушният поток през камерата за експозиция трябва да бъде внимателно контролиран, непрекъснато наблюдаван и записван най-малко на всеки час по време на всяка експозиция. Мониторингът на концентрацията в реално време на атмосферата за изпитване (или на стабилността във времето) представлява цялостно измерване на всички динамични параметри и предоставя непряко средство за контрол на всички относими динамични параметри, свързани с инхалацията. Ако се извършва мониторинг на концентрацията в реално време, честотата на измерването на въздушния поток може да бъде намалена до едно единствено измерване на експозиция дневно. Специално внимание следва да се обърне на избягване, при камери за експозиция само през носа, на повторно инхалиране. Концентрацията на кислород следва да бъде не по-малко от 19 %, а концентрацията на въглероден диоксид не трябва да превишава 1 %. Ако има основание да се смята, че тези стандарти не могат да бъдат спазени, концентрациите на кислорода и на въглеродния диоксид следва да се измерват. Ако измерванията в първия ден от експозицията показват, че тези газове са на подходящи равнища, допълнителни измервания не следва да са необходими.

##### Температура и относителна влажност на камерата

23. Температурата в камерата трябва да се поддържа на  $22 \pm 3$  °C. Относителната влажност в зоната на дишане на животните — както за експозиция само през носа, така и за експозиция на цялото тяло — трябва да бъде наблюдавана непрекъснато и записвана на всеки час по време на всяка експозиция, когато е възможно. Предпочита се относителната влажност да бъде поддържана в диапазона между 30 и 70 %, но това може или да се окаже непостижимо (например при изпитване на смеси на основата на вода), или да не може да бъде измерено поради въздействие на изпитвания химикал върху метода за изпитване.

##### Изпитван химикал: Номинална концентрация

24. Когато е осъществимо, номиналната концентрация в камерата за експозиция следва да се изчислява и записва. Номиналната концентрация е масата на генерирания изпитван химикал, разделена на общия обем въздух, преминал през системата на инхалационната камера. Номиналната концентрация не се използва за характеризане на експозицията на животните, а сравнение между номиналната и действителната концентрация дава показание за ефикасността на генериране на системата за изпитване и следователно може да се използва за откриване на проблеми при генерирането.

**Изпитван химикал: Действителна концентрация**

25. Действителната концентрация е концентрацията на изпитвания химикал в зоната на дишане на животните в дадена инхалационна камера. Действителни концентрации могат да бъдат получени чрез специфични методи (например чрез пряко пробовземане, свързани с адсорбция или с химична реакция методи и последващо аналитично охарактеризиране) или чрез неспецифични методи като гравиметричен анализ с филтруване. Използването на гравиметричен анализ е приемливо само за еднокомпонентни прахови аерозоли или за аерозоли от ниско летливи течности и следва да бъде подпомогнато от подходящо специфично за изпитвания химикал охарактеризиране чрез предварително изследване. Концентрацията на многокомпонентни прахови аерозоли също може да бъде определяна чрез гравиметричен анализ. Това обаче изисква аналитични данни, които доказват, че съставът на намиращия се във въздуха материал е подобен на този на изходния материал. Ако тази информация не е налична, може да е необходимо извършване на анализ на изпитвания химикал (в идеалния случай в състоянието, в което е разтворен във въздуха), повтарящо се на редовни интервали по време на изследването. За агенти в аерозолна форма, които могат да се изпаряват или да сублимират, следва да се покаже, че всички фази са събрани по избрания метод.
26. По възможност за времетраенето на изследването следва да се използва една партида от изпитвания химикал, като изпитваната проба следва да се съхранява при условия, при които се поддържат нейната чистота, хомогенност и устойчивост. Преди началото на изследването следва да се направи охарактеризиране на изпитвания химикал, включително неговата чистота и, ако е технически осъществимо, идентичността, както и количествата на идентифицираните замърсители и примеси. Това може да бъде доказано от, но не се ограничава до, следните данни: време на задържане и относителна площ на пика, получена чрез маспектрометрия или газова хроматография молекулна маса, или други оценки. Въпреки че лабораторията, извършваща изпитвания, не носи отговорност за идентифицирането на пробата за изпитване, може да е разумно лабораторията, извършваща изпитвания, да потвърди охарактеризирането на финансиращия, дори и в ограничена степен (например цвят, физична природа и др.).
27. Атмосферата на експозицията трябва да бъде поддържана постоянна, доколкото е практически възможно. Могат да се използват устройства за мониторинг в реално време, като аерозолен фотометър (за аерозоли) или анализатор на общо съдържание на въглеродороди (за пари), за да се докаже стабилността на условията на експозиция. Действителната концентрация в камерата трябва да се измерва най-малко 3 пъти през всеки ден, в който се извършва експозиция, за всяко равнище на експозицията. Ако това не е осъществимо поради ограничена скорост на въздушния поток или поради ниска концентрация, допустимо е по едно пробовземане през всеки период на експозиция. В идеалния случай тази проба следва след това да бъде вземана през целия период на експозиция. Индивидуалните проби от концентрацията в камерата не трябва да се отклоняват от средната концентрация в камерата с повече от  $\pm 10\%$  за газовете и парите или  $\pm 20\%$  за течните или твърдите аерозоли. Времето за уравнивяване на камерата ( $t_{95}$ ) следва да се изчислява и докладва. Продължителността на експозицията обхваща времето за генериране на изпитвания химикал. Тук се взема под внимание времето за уравнивяване на камерата ( $t_{95}$ ) и за разпад. Указания за оценката на  $t_{95}$  могат да бъдат намерени в GD 39 (2).
28. При много сложни смеси, съставени от газове/пари и аерозоли (например атмосфера след горене и изпитвани химикали, отделени от целеви продукти/оборудване за крайна употреба), всяка фаза може да реагира по различен начин в инхалационната камера. Следователно от всяка фаза (газ/пари и аерозол) следва да бъде избрано най-малко едно вещество (аналит), служещо като показател, като обичайно това е основното активно вещество в сместа. Когато изпитваният химикал е смес, аналитичната концентрация следва да се докладва за цялата смес, а не само за активната съставка или за веществото, служещо като показател (аналита). Допълнителна информация относно действителните концентрации може да бъде намерена в GD 39 (2).

**Изпитван химикал: Разпределение според размера на частиците**

29. Разпределението според размера на частиците на аерозоли трябва да се определя най-малко веднъж седмично за всяка концентрация, като се използва каскаден импактор или алтернативен инструмент, като например спектрометър за определяне на размера на аеродинамични частици. Ако може да бъде доказана равностойността на резултатите, получени от каскадния импактор и от алтернативния инструмент, тогава алтернативният инструмент може да бъде използван по време на цялото изследване.
30. Успоредно с основния инструмент следва да бъде използвано второ устройство, като например гравиметричен филтър или погълтител с въвеждаща тръбичка (импинджер)/барботиращ апарат, за да се потвърди ефикасността на пробовземането на основния инструмент. Масовата концентрация, получена чрез анализ на размера на частиците, следва да бъде в рамките на разумни граници от масовата концентрация, получена чрез филтруване [вж. GD 39 (2)]. В случай че тяхната равностойност може да бъде доказана при всички изпитвани концентрации в ранния етап на изследването, могат да не се извършват допълнителни измервания за потвърждение. От съображения за хуманно отношение към животните следва да се вземат мерки за свеждане до минимум на недостатъчните за формулиране на заключение данни, които могат да доведат до необходимост от повтаряне на дадено изследване.
31. Определяне на размера на частиците трябва да бъде направено за пари, ако съществува вероятност кондензация на парите да доведе до образуване на аерозол, или ако бъдат открити частици в атмосфера от пари с потенциал за смесени фази.

## НАБЛЮДЕНИЯ

32. Върху животните трябва да бъдат извършвани клинични наблюдения преди, по време на периода на експозиция и след него. Може да има показания за по-чести наблюдения в зависимост от отговора на животните по време на експозицията. Когато наблюдението на животните е възпрепятствано от използването на ограничителни тръби за животните, недостатъчно осветени камери за експозиция на цялото тяло, или непрозрачна атмосфера, животните следва да се наблюдават внимателно след експозицията. При наблюденията преди експозицията на следващия ден, може да се извърши оценка на всякаква обратимост или задълбочаване на токсичните ефекти.
33. Всички наблюдения се записват в поддържани за всяко животно индивидуални записи. Когато животните са умъртвени по хуманни причини или са намерени мъртви, времето на смъртта им следва да бъде записано колкото е възможно по-точно.
34. Наблюденията в клетките следва да включват изменения в кожата и козината, очите и лигавиците; изменения в дихателната и кръвоносната системи, изменения в нервната система, както и в соматомоторната активност и моделите на поведение. Вниманието следва да бъде насочено към наблюдения на треперене, конвулсии, сплюоотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Измерването на ректалната температура може да предостави подкрепящи доказателства за рефлекторно забавено дишане или хипотермия/хипертермия, свързани с третирането или затвореното пространство. В протокола от изследването могат да бъдат включени допълнителни оценки, като кинетика, биомониторинг, функция на белите дробове, задържане на малко разтворими материали, които се натрупват в белодробната тъкан, и промени в поведението.

## ТЕЛЕСНО ТЕГЛО

35. Индивидуалното телесно тегло на животните следва да се записва непосредствено преди първата експозиция (ден 0), по два пъти на седмица след това (например: в понеделник и в петък, за доказване на възстановяване през уикенд, в който не е извършвана експозиция, или в даден времеви интервал, за да се даде възможност за оценяване на системната токсичност), и към момента на настъпване на смъртта или умъртвяването. Ако няма ефекти през първите 4 седмици, телесното тегло може да се измерва веднъж седмично за останалото време от изследването. Измерването на теглото на животните от сателитните групи (за обратимост) (в случай на използване на такива) следва да продължава един път седмично през целия период на възстановяване. При прекратяването на изследването всички животни следва да бъдат претеглени непосредствено преди умъртвяването, за да се даде възможност за изчисляване без изместване на съотношенията между теглото на органите и на цялото тяло.

## КОНСУМАЦИЯ НА ХРАНА И ВОДА

36. Консумацията на храна трябва да се измерва всяка седмица. Консумацията на вода също може да се измерва.

## КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ

37. Оценка за клиничната патология следва да бъдат правени за всички животни, включително тези в контролни и сателитни групи (за обратимост), когато те се умъртвяват. Интервалът от време между края на експозицията и вземането на кръв трябва да се записва, особено когато възстановяването на изследваната крайна точка е бързо. Има показания за вземане на проби след края на експозицията за параметрите с кратък плазмен полуживот (напр. СОНb, СНЕ и MetHb).
38. В таблица 1 са изброени параметрите на клиничната патология, които обичайно се изискват за всички токсикологични изследвания. Изследване на урина рутинно не е необходимо, но може да се извършва, ако се счита че е необходимо поради очаквана или наблюдавана токсичност. Ръководителят на изследването може да избере да оцени допълнителни параметри, за да охарактеризира по-добре токсичността на даден изпитван химикал (напр. холинестераза, липиди, хормони, киселинно-алкално равновесие, метхемоглобин или телца на Heinz, креатинкиназа, миелоидно-еритроидно съотношение, тропонин, газове в артериалната кръв, лактатдеhidрогеназа, сорбиталдеhidрогеназа, глутаматдеhidрогеназа, и гама-глутамилтранспептидаза).

Таблица 1

## Стандартни параметри на клиничната патология

Хематология	
Брой на еритроцитите	Общ брой на левкоцитите
Хематокрит	Диференциален брой на левкоцити
Концентрация на хемоглобина	Брой на тромбоцитите
Средно съдържание на хемоглобин	Потенциал за съсирване (изберете едно от посочените):
Среден обем на еритроцитите	— протромбиново време
Средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите	— време за съсирване
Ретикулоцити	— частично тромбопластиново време

Клинична химия	
Глюкоза (*)	Аланинаминотрансфераза
Общ холестерол	Аспартатаминотрансфераза
Триглицериди	Алкална фосфатаза
Азот в кръвна уреа	Калий
Общ билирубин	Натрий
Креатинин	Калций
Общо белтъци	Фосфор
Албумин	Хлорид
Глобулин	
Изследвания на урина (незадължителни)	
Външен вид (цвет и мътност)	Общо белтъци
Обем	Глюкоза
Относителна плътност или осмолалност	Кръв/кръвни клетки
pH	

(\*) Тъй като продължителен период на гладуване може да доведе до изместване при измерването на глюкозата за третираните животни в сравнение с контролните, ръководителят на изследването следва да определи дали е целесъобразно гладуването на животните. Ако се прилага период на гладуване, същият следва да бъде съобразен с използвания животински вид; за плъхове той може да бъде 16 h (гладуване през нощта). Определянето на глюкоза на гладно може да се извърши след гладуването през нощта през последната седмица на експозиция или след гладуването през нощта преди аутопсията (в последния случай — заедно с всички други параметри на клиничната патология).

39. Когато има доказателства, че долните дихателни пътища (т.е. алвеолите) са основното място на отлагане и задържане, тогава бронхоалвеоларният лаваж (BAL) може да бъде избраната техника за количествен анализ на хипотетичните параметри доза-ефект, с насочване към алвеолит, възпаление на белите дробове и фосфолипидоза. Това позволява измененията на зависимостта доза-отговор и измененията във времето на уврежданията на алвеолите да бъдат проучени по подходящ начин. Течността от BAL може да бъде анализирана за общ и диференциален брой левкоцити, общо белтъци и лактатдеhidрогеназа. Други параметри, които могат да бъдат съобразени, са тези, които са показателни за лизозомни увреждания, фосфолипидоза, фиброза и възпаление, причинено от дразнене или от алергия, което може да включва определяне на провъзпалителни цитокини/хемокини. Измерванията на BAL по принцип допълват резултатите от хистопатологичните изследвания, но не могат да ги заместят. Насоки за това как да се извършва лаваж на белия дроб могат да бъдат намерени в GD 39 (2).

#### ОФТАЛМОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

40. Следва на всички животни да бъдат извършени офталмологични изследвания на очното дъно, пречупващите среди, ириса и конюнктивата, с използване на офталмоскоп или равностойно устройство, преди прилагането на изпитвания химикал, и — при прекратяването — на всички групи, експонирани на висока концентрация и на контролните групи. Ако се открият изменения в очите, всички животни в другите групи трябва да бъдат изследвани, включително сателитната група (за обратимост).

#### МАКРОСКОПСКА ПАТОЛОГИЯ И ТЕГЛО НА ОРГАНИ

41. Всички изпитвани животни, включително умрелите по време на изпитването или отстранени от изследването по причини, свързани с хуманното отношение към животните, следва да бъдат подложени на пълно обезкръвяване (ако е осъществимо) и на макроскопска аутопсия. Времето между края на последната експозиция на всяко животно и умъртвяването му следва да се записва. Ако аутопсията не може да се извърши веднага след откриването на мъртвото животно, трупът на животното трябва да бъде охладен (но не замразен) при температури, достатъчно ниски за да бъде сведена до минимум автолизата. Аутопсията следва да се извърши във възможно най-кратък срок, обичайно в рамките на един или два дни. Следва да бъдат записани всички макроскопски патологични изменения за всяко животно, като се обърне особено внимание на всякакви изменения в дихателните пътища.
42. В таблица 2 се изброяват органите и тъканите, които трябва да бъдат консервирани в подходяща среда по време на макроскопската аутопсия за хистопатологично изследване. Консервирането на поставените в средни скоби в таблицата органи и тъкани и на всякакви други органи и тъкани е по преценка на ръководителя на изследването. Органите с **удебелен** шрифт следва да бъдат почистени и претеглени като мокро тегло колкото е възможно по-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването им. Щитовидната жлеза и епидидимите следва да бъдат претегляни само при необходимост, тъй като артефакти от почистването могат да възпрепятстват хистопатологичната оценка. Тъканите и органите следва да бъдат фиксирани в 10 % буферизиран формалинов разтвор или друг подходящ фиксатор веднага след извършването на аутопсията и не по-малко от 24 до 48 часа преди почистването в зависимост от използвания фиксатор.

Таблица 2

## Органи и тъкани, консервирани по време на макроскопската аутопсия

<b>Надбъбречни жлези</b>	Хранопровод
Аорта	[Обонятелна луковица]
Костен мозък (и/или прясно фиксиран аспирант)	<b>Яйчници</b>
<b>Мозък</b> (включително части от главния мозък, малкия мозък и моста)	Панкреас
Цекум	Околоштитовидни жлези
Колон	Периферен нерв (седалищен или голямопищялен, за предпочитане в непосредствена близост до мускул)
Дванадесетопръстник	Хипофиза
<b>[Епидидими]</b>	Простатна жлеза
[Очи (ретина, оптичен нерв) и клепачи]	Право черво
Бедрена кост и колянна става	Слюнчени жлези
Жлъчен мехур (при наличие на такъв)	Семенни мехурчета
Хардерови жлези	Кожа
<b>Сърце</b>	Гръбначен мозък (шийно, гръдно и поясно ниво)
Илеум	<b>Далак</b>
Празно черво	Гръдна кост
<b>Бъбреци</b>	Стомах
[Слезни жлези (клепачни)]	Зъби
Ларинкс (3 равнища, включително основата на епиглотиса)	<b>Тестиси</b>
<b>Черен дроб</b>	<b>Тимус</b>
<b>Бял дроб</b> (всички лобове на едно равнище, включително главни бронхи)	<b>Щитовидни жлези</b>
Лимфни възли от областта на хилуса на белия дроб, особено при малко разтворими изпитвани химикали под формата на частици. За по-задълбочени изследвания и/или изследвания с имунна насоченост могат да се вземат предвид допълнителни лимфни възли, например от медиастиналната, цервикалната/субмандибуларната и/или аурикуларната области.	[Език]
Лимфни възли (дистално от входното място на увреждането)	Трахея (най-малко 2 равнища, включващи 1 надлъжен срез през хребетовидната структура и 1 напречен срез)
Млечна жлеза (женска)	[Уретер]
Мускул (бедрен)	[Уретра]
Нософарингсни тъкани (най-малко 4 равнища; 1 равнище следва да включва нософарингския канал и назално асоциираната лимфоидна тъкан (NALT)	Пикочен мехур
	<b>Матка</b>
	Прицелни органи
	Всички макроскопски увреждания и разраствания на тъканна маса

43. Белите дробове следва да се отстранят невредими, да се претеглят и третират с подходящ фиксатор при налягане от 20—30 cm воден стълб, за да се гарантира запазване на структурата им (5). Срезове следва да се събират за всички лобове на едно равнище, включително главните бронхи, но ако е извършен лаваж на белия дроб, следва да бъдат направени срезове на три равнища на лоба, на който не е извършен лаваж (не серийни срезове).

44. Най-малко 4 равнища на нософарингните тъкани трябва да бъдат изследвани, едното от които следва да включва нософарингния канал (5) (6) (7) (8) (9), за да се даде възможност за адекватно изследване на плоския, преходния (респираторен без реснички), респираторния (респираторен с реснички) и обонятелния епители, и дренажната лимфна тъкан (NALT) (10) (11). Три равнища на ларинкса трябва да бъдат изследвани, като едно от тези равнища следва да включва основата на епиглотиса (12). Най-малко две равнища на трахеята следва да бъдат изследвани, включително един надлъжен срез през хребетовидната структура на разклонението на извънбелодробните бронхи и един напречен срез.

#### ХИСТОПАТОЛОГИЯ

45. Следва да бъде направена хистопатологична оценка на всички органи и тъкани, изброени в таблица 2, за контролната и експонираната на висока концентрация групи, и за всички животни, които са умрели или са умъртвени по време на изследването. Особено внимание следва да се обърне на дихателните пътища, прицелните органи и макроскопските увреждания. Органите и тъканите, които имат увреждания от групата, експонирана на висока концентрация, следва да бъдат изследвани във всички групи. Ръководителят на изследването може да избере да се извършат хистопатологични оценки за допълнителни групи, за да се докаже ясна зависимост концентрация-отговор. Когато се използва сателитна група (за обратимост), хистопатологичната оценка следва да се извършва на всички тъкани и органи с показан ефект при третираните групи. Ако са налице прекомерен брой случаи на ранна смърт или други проблеми в групата, експонирана на висока концентрация, които застрашават значимостта на данните, следващата по-ниска концентрация следва да бъде хистопатологично изследвана. Трябва да се направи опит за съпоставяне на макроскопските наблюдения и микроскопските находки.

#### ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

##### Данни

46. Следва да се предоставят индивидуалните данни за животните относно тяхното телесно тегло, консумация на храна, клинична патология, макроскопска патология, теглото на органите и хистопатология. Данните от клиничните наблюдения следва да бъдат обобщени в таблична форма, показваща за всяка от изпитваните групи броя на използваните животни, броя на животните, проявяващи специфични признаци за токсичност, броя на животните, намерени мъртви по време на изпитването или умъртвени по хуманни причини, времето на настъпване на смъртта на отделните животни, описание и развитие във времето на токсичните ефекти и обратимостта им, както и находките при аутопсията. Всички резултати, количествени и инцидентни, трябва да бъдат оценени с помощта на подходящ статистически метод. Може да се използва всеки общоприет статистически метод и статистическите методи следва да бъдат избрани при планирането на изследването.

##### Доклад от изпитването

47. Докладът от изпитването по целесъобразност следва да включва следната информация:

##### *Изпитвани животни и отглеждане*

- Описание на условията в клетките, включително: брой (или промяна в броя) на животните в една клетка, материал за постилане, температура и относителна влажност на околната среда, продължителност на излагане на светлина и идентифициране на хранителния режим.
- Използван вид/порода и обосновка за използване за видове, различни от плъх. Източник и данни за минали периоди могат да бъдат предоставени, ако са за животни, експонирани при сходни условия на експозиция, отглеждане и режим на гладуване.
- Брой, възраст и пол на животните.
- Метод на случаен подбор.
- Описание на всякакво кондициониране преди изпитването, включително хранителен режим, карантина и лечение на заболявания.

##### *Изпитван химикал*

- Физична форма, чистота и, където е относимо, физични и химични свойства (включително изомеризация).
- Идентификационни данни и номер съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси (CAS), ако са известни.

##### *Носител*

- Обосновка за използването на носител и обосновка за избора на носителя (ако е различен от вода).
- Данни за минали периоди или паралелни данни, доказващи че носителят не пречи на резултата от изследването.

*Инхалационна камера*

- Подробно описание на инхалационната камера, включително обем и схема.
- Източник и описание на оборудването, използвано за експозицията на животните, както и за генерирането на атмосферата.
- Оборудване за измерване на температурата, относителната влажност, размера на частиците и действителната концентрация.
- Източник на въздух и система, използвана за кондициониране.
- Използвани методи за калибриране на оборудването за гарантиране на хомогенна атмосфера за изпитване.
- Разлика в налягането (положителна или отрицателна).
- Отвори за експозиция за всяка камера (експозиция само през носа); местоположение на животните в камерата (експозиция на цялото тяло).
- Устойчивост на атмосферата за изпитване.
- Разположение на датчиците за температура и относителна влажност и пробовземане на атмосферата за изпитване в камерата.
- Обработка на доставяния/извличания въздух.
- Скорости на въздушния поток, скорост на въздушния поток при отвор за експозиция (експозиция само през носа) или брой животни на камера (експозиция на цялото тяло).
- Време за уравнисяване на инхалационната камера ( $t_{95}$ ).
- Брой изменения на обема на час.
- Измервателни прибори (ако е приложимо).

*Данни за експозицията*

- Обосновка за избора на целева концентрация в основното изследване.
- Номинални концентрации (обща маса на изпитвания химикал, генерирана в инхалационната камера, разделена на преминалия през камерата обем въздух).
- Действителни концентрации на изпитвания химикал, взети от зоната на дишане на животните; за смеси, които произвеждат хетерогенни физични форми (газове, пари, аерозоли), всяка от тези форми може да бъде анализирана отделно.
- Всички концентрации във въздуха следва да бъдат докладвани в единици за масова концентрация ( $\text{mg/l}$ ,  $\text{mg/m}^3$  и т.н.), а не в единици за отношение на обем (ppm, ppb и т.н.).
- Разпределение на частиците по размер, аеродинамичен диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD) и геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ), включително методите за изчисляването им. Отделните анализи на размерите на частиците следва да бъдат докладвани.

*Условия на изпитването*

- Подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал, включително подробна информация за всякакви процедури, използвани за намаляване на размера на частиците на твърди материали или за приготвяне на разтвори на изпитвания химикал.
- Описание (за предпочитане включващо схема) на оборудването, използвано за генериране на атмосферата за изпитване и за експозиция на животните на атмосферата за изпитване.
- Подробна информация за оборудването, използвано за наблюдение на температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата (т.е. разработване на калибрационна крива).
- Подробна информация за оборудването, използвано за пробовземане за определяне на концентрацията и разпределението на частиците по размери в камерата.
- Подробна информация за използвания метод за анализ на химикала и за валидирането на метода (включително и ефикасността на добива на изпитвания химикал от матрицата на пробата).



- Метод на случаен подбор при разпределяне на животните в изпитвани и контролни групи.
- Подробна информация за качеството на храната и водата (включително тип на хранителния режим/източник, водоизточник).
- Обосновката за избора на концентрациите за изпитване.

#### Резултати

- Таблично представяне на данните за температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата.
- Таблично представяне на данните за номиналната и действителната концентрация в камерата.
- Таблично представяне на данните за размера на частиците, включително аналитични данни за пробовземането, за разпределянето на частиците по размери, и изчисления на MMAD и  $\sigma_g$ .
- Таблично представяне на данните за отговора и равнището на концентрацията за всяко животно (т.е. животни, показващи признаци на токсичност, включително смъртност, природа, сила, време на настъпване и продължителност на ефектите).
- Таблично представяне на данните за индивидуалното телесно тегло.
- Таблично представяне на данните за консумацията на храна.
- Таблично представяне на данните от клиничната патология.
- Находки при аутопсията и хистопатологични находки за всяко животно, ако има такива.

#### Дискусия и интерпретиране на резултатите

- Особено внимание следва да се обърне на описанието на методите, използвани за спазване на критериите на настоящия метод за изпитване, например пределната концентрация, или размера на частиците.
- В контекста на цялостните констатации следва да бъде разгледан въпросът дали частиците могат да бъдат вдишвани, особено ако не е било възможно спазването на критериите за размер на частиците.
- Съгласуваността на методите, използвани за определяне на номиналните и действителните концентрации, както и отношението на действителната концентрация към номиналната концентрация, трябва да бъдат включени в общата оценка на изследването.
- Следва да бъдат разгледани вероятната причина за смъртта и преобладаващият начин на действие (системно срещу локално).
- Трябва да се даде обосновка, ако е имало необходимост от умъртвяване по хуманен начин на животни, изпитващи болка или показващи признаци на силен и продължителен дистрес, въз основа на критериите в Ръководството на ОИСП за хуманен край (3).
- Трябва да бъде идентифициран прицелният орган(и).
- Трябва да бъдат определени нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) и най-ниската доза, при която се наблюдава неблагоприятен ефект (LOAEL).

#### ПРЕПРАТКИ:

- (1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline № 413, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan.E and Redden JC (1994). *Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies*. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

- 
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
  - (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.
  - (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.
  - (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
  - (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
  - (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
  - (11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
  - (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
  - (13) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006 (ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1).
-

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Изпитван химикал:** всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

## Б.30. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ

## УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 452 на ОИСП (ОИСП TG 452) (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване 452 е прието през 1981 г. Разработването на този преработен метод Б.30 беше счегено за необходимо, за да бъдат отразени последните достижения в областта на хуманното отношение към животните и нормативните изисквания (1) (2) (3) (4). Актуализирането на настоящия метод за изпитване Б.30 е проведено успоредно с преразглеждането на глава Б.32 („Изследвания за канцерогенност“) и глава Б.33 („Комбинирани изследвания за хронична токсичност/канцерогенност“) от настоящото приложение, с цел получаване на допълнителна информация от животните, използвани в изследването, и предоставяне на допълнителна подробна информация относно избора на доза. Настоящият метод за изпитване е разработен за използване при изпитвания на широк кръг от химикали, включително пестициди и промишлени химикали.
2. По-голямата част от изследванията за хронична токсичност се извършват върху различни видове гризачи и следователно настоящият метод за изпитване е предназначен да се прилага основно за изследвания, провеждани върху тези видове. Ако за такива изследвания се изисква използване на видове, различни от гризачи, принципите и процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, заедно с тези, разгледани в глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“) (5), могат също така да се прилагат, с подходящи изменения, така както са очертани в Ръководство на ОИСП № 116 за планиране и провеждане на изследвания за хронична токсичност и за канцерогенност (6).
3. Трите основни пътя на прилагане, използвани при изследванията за хронична токсичност, са орален, дермален и инхалационен. Изборът на път на прилагане зависи от физичните и химичните характеристики на изпитвания химикал и от преобладаващия път на експозиция при хора. Допълнителна информация за избора на път на експозиция е представена в Ръководство № 116 на ОИСП (6).
4. Настоящият метод за изпитване е съсредоточен върху експозицията по орален път — най-често използваният път в изследванията за хронична токсичност. Макар че дългосрочните изследвания за хронична токсичност, включващи експозиция по дермален или инхалационен път, могат също да бъдат необходими за оценка на риска за човешкото здраве и/или могат да бъдат изисквани по силата на някои нормативни уредби, посочените два пътя на експозиция са със значителна техническа сложност. Такива изследвания трябва да се планират за всеки конкретен случай, въпреки че методът за изпитване за оценка на хронична токсичност чрез прилагане по орален път би могъл да послужи за основа на протокол за изследвания, включващи инхалационен и/или дермален път, по отношение на препоръките за периодите за третиране, клиничните параметри и параметрите на патологията, и други. Налични са указания на ОИСП за прилагане на изпитвани химикали по инхалационен (6) (7) и дермален път (6). Глава Б.8 от настоящото приложение (8) и глава Б.29 от настоящото приложение (9), заедно с Ръководство на ОИСП за изпитване за остра инхалаторна токсичност (7), следва специално да бъдат консултирани при планирането на по-дългосрочни изследвания, включващи експозиция по инхалационен път. Глава Б.9 от настоящото приложение (10) следва да бъде консултирана в случай на изпитване, провеждано по дермален път.
5. Изследването за хронична токсичност предоставя информация за възможните рискове за здравето, произтичащи по всяка вероятност от повтаряща се експозиция през значителна част от продължителността на живота на вида, който се използва при изследването. Изследването предоставя информация за токсичните ефекти на изпитвания химикал; посочва прицелните органи и възможността за акумулиране. То може също така да предостави оценка на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект, което може да бъде използвано за установяване на критерии за безопасност при експозиция на хора. Набляга се и върху нуждата от обстойни клинични наблюдения върху животните с цел да се получи колкото е възможно повече информация.
6. Целите на изследванията, обхванати от настоящия метод за изпитване, включват:
  - идентификацията на хроничната токсичност на изпитван химикал,
  - идентификацията на прицелните органи,
  - характеризиране на зависимостта доза-отговор,
  - идентификация на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) или на отправната точка за установяване на еталонна доза (BMD),
  - прогнозиране на ефекти на хронична токсичност при нива на експозиция на човека,
  - предоставяне на данни на изпитване на хипотези относно начина на действие (6).

## ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

7. При оценката на токсикологичните характеристики на даден изпитван химикал цялата достъпна информация за изпитвания химикал следва да бъде разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждането на изследването, с цел да се съсредоточи планът на изследването върху по-ефикасно изпитване на потенциала за хронична токсичност и да се сведе до минимум използването на животни. Информация, която ще помогне за съставянето на план на изследването, включва идентичност, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; всякаква информация за начина на действие; резултатите от всякакви изпитвания за токсичност, извършени *in vitro* или *in vivo*; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност и токсикологични данни за химикали със сходна структура; достъпни токсикокинетични данни (данни за кинетика на еднократна, а също и на повтаряща се доза, където са достъпни) и данни, получени от други изследвания с повтаряща се експозиция. Определянето на хроничната токсичност трябва да се извършва само след получаване на първоначална информация относно токсичността от 28-дневно и/или 90-дневно изпитвания за токсичност при повтаряща се доза. Поетапният подход за изпитване за хронична токсичност следва да се разглежда като част от цялостната оценка на възможните неблагоприятни въздействия на даден изпитван химикал върху здравето (11) (12) (13) (14).
8. Статистическите методи, които са най-подходящи за анализ на резултатите, като се имат предвид планът на изследването и целите, следва да бъдат определени преди началото на изследването. Въпросите, които трябва да бъдат разгледани, включват проверка дали статистическите данни следва да включват корекция за преживяемост и анализ в случай на преждевременно прекратяване на използването на една или повече групи. Насоки относно подходящите статистически анализи и ключови препратки към международно приети статистически методи са дадени в Ръководство № 116 (6), също и в Ръководство № 35 за анализ и оценка на изследвания за хронична токсичност и канцерогенност (15).
9. При провеждане на изследването за хронична токсичност ръководните принципи и съображенията, формулирани в Ръководство № 19 на ОИСП относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността (16), и по-специално точка 62 от него, следва винаги да бъдат спазвани. В тази точка е посочено, че „при изследвания, включващи прилагане на повтарящи се дози, когато дадено животно показва клинични признаци, които са прогресивни, водещи до по-нататъшно влошаване на състоянието, следва да се вземе информатирано решение дали да се разреши или не животното да бъде умъртено по хуланен начин. Решението следва да включва съображение относно стойността на информацията, която ще бъде получена от продължаване на изследването с даденото животно във връзка с общото му състояние. Ако се вземе решение за продължаване на изпитването с животното, честотата на наблюденията трябва да се увеличи доколкото е необходимо. Би било възможно също така, без да се засяга неблагоприятно целта на изпитването, временно да бъде преустановено дозирането, ако това ще допринесе за премахване на болката или дистреса, или да бъде намалена дозата на изпитването.“
10. Подробни насоки относно принципите на избора на доза за изследванията за хронична токсичност и канцерогенност, както и дискутирането им, могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (6), както и в две публикации на Международния институт за науките за живота (17) (18). Основната стратегия за избор на доза зависи от основната цел или цели на изследването (точка 6). При избора на подходящи нива на доза следва да се постигне равновесие между скрининга за опасност, от една страна, и характеризирането на отговорите на ниски дози и тяхната уместност, от друга страна. Това важи особено за случаите, в които следва да се проведе комбинирано изследване за хронична токсичност и за канцерогенност (глава Б.33 от настоящото приложение) (точка 11).
11. Следва да се разгледа възможността за провеждане на комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност (глава Б.33 от настоящото приложение), вместо отделно провеждане на изследване за хронична токсичност (настоящият метод за изпитване Б.30) и на изследване за канцерогенност (глава Б.32. от настоящото приложение). Комбинираното изпитване осигурява по-голяма ефикасност по отношение на време и разходи в сравнение с провеждането на две отделни изследвания, без да се прави компромис с качеството на данните нито във фазата на изпитване за хронична токсичност, нито във фазата за канцерогенността. Следва обаче да се обърне особено внимание на принципите на избора на доза (точка 9 и 20—25), когато се предприема комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност (глава Б.33точкаот настоящото приложение), и също така се признава, че по някои нормативни уредби може да се изискват отделни изследвания.
12. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в края на тази глава и в Ръководство № 116 (6).

## ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

13. Изпитваният химикал се прилага ежедневно, в постепенно нарастващи дози, на няколко групи опитни животни, обикновено за срок от 12 месеца, въпреки че по-дълги или по-кратки продължителности също могат да бъдат избрани в зависимост от нормативните изисквания (вж. точка 33). Тази продължителност е избрана да бъде достатъчно дълга, за да позволи проявяване на всякакви ефекти от кумулативна токсичност без водещите до невъзможност за разграничаване ефекти, внасяни от старчески изменения. Отклоненията от продължителността на експозиция от 12 месеца трябва да бъдат обосновани, особено в случаите с по-кратка продължителност. Изпитваният химикал обикновено се прилага по орален път, въпреки че изпитването по инхалаторен или дермален път може също да е подходящо. Планът на изследването може също да включва едно или повече междинни умъртвявания, например на 3 и 6 месеца, като могат да бъдат включени допълнителни групи животни за да се съобрази това (вж. точка 19). По време на периода на прилагането животните се наблюдават отблизо за признаци на токсичност. Животните, които умират или са умъртвени по време на изпитването, се аутопсират, а преживелите животни се умъртвяват и се аутопсират при приключването на изпитването.

**ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Избор на животински вид**

14. Настоящият метод за изпитване основно обхваща оценка на хроничната токсичност при гризачи (вж. точка 2), въпреки че се признава, че подобни изследвания с животни, различни от гризачи, могат да се изискват по силата на някои нормативни уредби. Изборът на вида следва да се обоснове. Планирането и провеждането, при необходимост, на изследвания за хронична токсичност върху видове, различни от гризачи, следва да се основава на принципите, залегнали в настоящия метод за изпитване заедно с тези от глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“) (5). Допълнителна информация за избора на вид и порода е представена в Ръководство № 116 (6).
15. За настоящия метод за изпитване предпочитаният вид гризачи е плъхът, въпреки че могат да се използват и други видове от гризачи, например мишки. Плъховете и мишките са предпочитани опитни модели поради тяхната относително кратка продължителност на живота, широкото им използване при фармакологични и токсикологични изследвания, тяхната склонност към образуване на тумори, както и наличието на достатъчно характеризирани породи. В резултат на тези характеристики е налично голямо количество информация относно тяхната физиология и патология. Следва да се използват здрави млади полово зрели животни от обичайно използваните за лабораторни изследвания породи. Изследването за хронична токсичност трябва да се провежда върху животни от една и съща порода и източник като тези, които са използвани при предварителното(ите) изследване(ия) за токсичност с по-малка продължителност. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни.

**Условия на отглеждане и хранене**

16. Животните могат да бъдат настанени в клетките индивидуално или на малки групи от един и същ пол; индивидуалното настаняване следва да бъде разглеждано само ако е научно обосновано (19) (20) (21). Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C (± 3 °C). Въпреки че относителната влажност трябва да е най-малко 30 % и за предпочитане да не надвишава 70 %, освен по време на почистване на помещението, целта следва да е 50—60 %. Осветлението следва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Хранителният режим следва да отговаря на всички изисквания към храната за съответния изпитван вид, а съдържанието в храната на замърсители, включващи, но без да се ограничават до остатъци от пестициди, устойчиви органични замърсители, фитострогани, тежки метали и микотоксини, които биха могли да окажат въздействие върху резултата от изпитването, трябва да е възможно най-ниско. Следва периодично да се генерира аналитична информация относно равнищата на хранителните вещества и замърсителите в хранителния режим, най-малко в началото на изследването и когато има промяна в използваната партида, и същата следва да бъде включена в окончателния доклад. По подобен начин следва да бъде предоставена аналитична информация за питейната вода, използвана в изследването. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от необходимостта да се осигури подходящо смесване с изпитвания химикал и да бъдат изпълнени изискванията за хранене на животните, когато изпитваният химикал се прилага чрез хранителния режим.

**Подготовка на животните**

17. Следва да се използват здрави животни, които предварително са се аклиматизирали към лабораторните условия в продължение най-малко на 7 дни и върху които не са извършвани предходни опитни процедури. При гризачите дозирането на животните следва да започне колкото е възможно по-скоро след отбиването и аклиматизацията и, за предпочитане, преди животните да навършат 8 седмици. Опитните животни трябва да се опишат по отношение на вид, порода, източник за доставка, пол, телесно тегло и възраст. При започване на изследването колебанието на индивидуалните стойности на телесното тегло на използваните животни трябва да бъде минимално и да не превишава ± 20 % от средното тегло на всички животни от същия пол в рамките на изследването. Животните се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за третиране. След прилагането на подбора на случаен принцип следва да няма значителни разлики между средните стойности на телесното тегло в отделните групи в рамките на съответния пол. Ако съществуват статистически значими разлики, тогава стъпката по подбор на случаен принцип трябва да се повтори, ако е възможно. За всяко животно се определя уникален идентификационен номер и му се поставя постоянна маркировка с този номер чрез поставяне на татуировка, имплантиране на микрочип или чрез друг подходящ метод.

**ПРОЦЕДУРА****Брой и пол на животните**

18. Следва да се използват и двата пола. Следва да се използва достатъчен брой животни по такъв начин че, при приключване на изследването, на разположение за подробна биологична и статистическа оценка да са достатъчно животни във всяка група. За гризачи най-малко 20 животни от пол за група следва да се използват по принцип при всяко ниво на доза, докато за животни, различни от гризачи се препоръчва използване най-малко на 4 от пол за група. При изследвания, включващи мишки, могат да бъдат необходими допълнителни животни във всяка дозирана група за извършване на всички изисквани хематологични определяния.

**Планиране на междинни умъртвявания, сателитни групи и животни от индикаторна група**

19. Проучването може да предвижда междинни умъртвявания (най-малко 10 животни от пол от група), например на 6 месеца, за предоставяне на информация за напредването на токсикологични изменения и механистична информация, ако е научно обосновано. Когато такава информация вече е достъпна от предходни изследвания на изпитвания химикал за токсичност при повтарящи се дози, възможно е междинните умъртвявания да не са

научно обосновани. Могат да бъдат включени също и сателитни групи, за мониторинг на обратимостта на всякакви токсикологични промени, причинени от изпитвания химикал, който е предмет на проучването; те обикновено са ограничени до най-високото ниво на доза за изследването, плюс контрол. Допълнителна индикаторна група от животни (обикновено по 5 животни от всеки от двата пола) може също да бъде включена, за мониторинг на здравния статус по време на изследването, ако е необходимо (22). Ако се планира междинно умъртвяване или включване на сателитна група или индикаторна група, броят на животните, включени в плана на изследването, трябва да бъде увеличен с броя животни, които се планира да бъдат умъртвени преди приключване на изследването. Тези животни обикновено трябва да преминат през същите наблюдения, както животните във фаза хронична токсичност на основното изследване, включително телесно тегло, консумация на храна/вода, хематологични измервания, клинична биохимия и проучване на патологията, въпреки че също така може да се постанови (в групите за междинно умъртвяване) измерванията да се ограничат до специфични ключови измервания като невротоксичност или имунотоксичност.

#### Групи с определени дози и дозиране

20. Насоки по всички аспекти на избора на доза и интервалите между нивата на доза са предоставени в Ръководство № 116 (6). Следва да се използват най-малко три нива на доза и паралелен контрол, с изключение на случаите, когато се извършва изпитване при пределна концентрация (вж. точка 27). Нивата на доза обикновено са основани на резултатите от по-краткосрочни изследвания при повтаряща се доза, или на изследвания за определяне на обхвата, и следва да са съобразени с всякакви достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него химикали.
21. Освен ако не е ограничено от физичното или химичното естество, или от биологичните ефекти на изпитвания химикал, най-високото ниво на доза обикновено следва да се избере така, че да се установят основните прищелни органи и токсични ефекти, като същевременно се избягва страдание, силна токсичност, заболяемост или смърт. Като се вземат предвид факторите, изложени в точка 22 по-долу, най-високото ниво на доза трябва да бъде избрано така, че да предизвиква признаци на токсичност, доказвани например с потискане наддаването на тегло (около 10 %).
22. Въпреки това, в зависимост от целите на изследването (вж. точка 6), може да бъде избрана максимална доза, която да е по-ниска от дозата, доказваща наличието на токсичност, например, ако при дадена доза се проявява неблагоприятен ефект, който дава повод за загриженост, но който има незначително влияние върху продължителността на живота или телесното тегло. Максималната доза не трябва да надвишава 1 000 mg на kg телесно тегло дневно (пределна доза, вж. точка 27).
23. Нивата на доза и интервалите между тях могат да бъдат избрани така, че да бъдат установени зависимост доза-отговор и NOAEL, или други очаквани резултати от изследването, например BMD (вж. точка 25) при най-ниското ниво на доза. Фактори, които следва да бъдат разглеждани при поставянето на по-ниски дози, включват очаквания наклон на кривата доза-отговор, дозите, при които могат да настъпят важни промени в метаболизма или в начина на токсично действие, когато се очаква праг, или когато се очаква отправна точка за екстраполиране на ниски дози.
24. Избраните интервали между нивата на доза зависят от характеристиките на изпитвания химикал и не могат да бъдат предписани в настоящия метод за изпитване, но от двукратни до четирикратни интервали често дават добри параметри на изпитването, когато се използват за определяне на намаляващите нива на доза и добавянето на четвърта група за изпитване често се предпочита пред използване на големи интервали (например с кратност, надвишаваща 6—10 пъти) между дозирането. По принцип използване на кратност над 10 следва да се избягва и, ако се използва, следва да бъде обосновано.
25. Както е допълнително разглеждано в Ръководство № 116 (6), точки, които трябва да бъдат взети предвид при избора на доза, включват:
  - познати или предполагаеми нелинейни зависимости или инфлексни точки в зависимостта доза-отговор;
  - токсикокинетика и обхвати на дозиране, при които се получава, или не се получава, метаболитна индукция, насищане или нелинейна зависимост между външни и вътрешни дози;
  - увреждания-прекурсори, маркери на ефект или показатели за протичане в дълбочина на ключови биологични процеси;
  - ключови (или предполагаеми) аспекти на начина на действие, като например дози, при които започва да се проявява цитотоксичност, появяват се нарушения в хормоналните равнища и механизмите на хомеостазата, и др.;
  - области от кривата доза-отговор, в които е необходима особено устойчива оценка, напр. в обхвата на очакваната BMD или на предполагаем праг;
  - съобразяване на очаквани нива на експозиция на човека.
26. Контролната група не се третира или е контролна група за носителя в случаите, когато за въвеждането на изпитвания химикал се използва носител. С изключение на самата обработка с изпитвания химикал, животните в контролната група следва да се третират по същия начин като тези от групите за изпитване. Когато се използва носител, животните от контролната група се третират с най-големия обем носител измежду обемите, при които се третират групите на дози. Ако изпитваният химикал се прилага чрез хранителен режим и причинява значително намаляване на приема на храна поради понижени вкусови качества на хранителния режим, може да бъде полезна допълнителна контролна група, получаваща същото количество храна, която да служи като по-подходяща контрола.

27. Ако въз основа на информация от предварителни изследвания може да се очаква, че изпитването при едно ниво на доза, равностойно най-малко на 1 000 mg на kg телесно тегло на ден, и при използване на процедурите, описани за това изследване, вероятно няма да доведе до неблагоприятни въздействия и ако, въз основа на данни от структурно свързани химикали, не се очаква токсичност, то цялостно изследване с използване на три нива на доза може да не се счита за необходимо. Като горна граница може да се приложи 1 000 mg на kg телесно тегло на ден, с изключение на случаите, при които експозиция на хора подсказва нуждата от използване на по-високо ниво на доза.

#### **Приготвяне на дозите и прилагане на изпитвания химикал**

28. Изпитваният химикал обичайно се прилага през устата, чрез хранителния режим или питейната вода, или чрез хранене през сонда. Допълнителна информация за пътища и начини на прилагане е представена в Ръководство № 116 (6). Пътят и начинът на прилагане зависят от целта на изследването, физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, неговата биодостъпност и преобладаващия път и начин на експозиция на хора. Следва да се представи обосновка за избрания път и начин на прилагане. С оглед на хуманното отношение към животните, храненето по орален път през сонда обичайно следва да се избере само за онези агенти, за които този път и начин на прилагане е в разумна степен представителен за потенциалната експозиция на хора (напр. фармацевтични продукти). За химикали, свързани с хранителния режим или с околната среда, включително пестициди, прилагането е обичайно чрез хранителен режим или чрез питейната вода. Въпреки това, при някои сценарии, напр. професионална експозиция, прилагане по други пътища може да бъде по-подходящо.
29. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Трябва да бъдат разгледани следните характеристики на носителя и, съответно, други добавки: ефекти върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържането на изпитвания химикал; ефекти върху химичните свойства на изпитвания химикал, които могат да изменят токсикологичните му характеристики; и ефектите върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това — разтвор/емулсия в масло (напр. царевично олио), а след това — разтваряне в други носители. Когато се използват други носители освен водата, трябва да се познаят токсикологичните свойства на носителя. Следва да е достъпна информация относно стабилността на изпитвания химикал и хомогенността на разтворите за дозиране или на храната (в зависимост от случая) при условията на прилагане (напр. чрез хранителен режим).
30. За химикали, които се прилагат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството изпитван химикал не въздейства върху нормалното хранене и водния баланс. При дългосрочни изследвания за токсичност с прилагане чрез хранителния режим концентрацията на изпитвания химикал в храната по принцип не трябва да надвишава горна граница от 5 % от общото количество храна, с цел да се избегне небалансирано хранене. Когато изпитваният химикал се прилага с храната, може да се използва или постоянна концентрация в храната (mg/kg храна или ppm), или постоянно ниво на доза от гледна точка на телесното тегло на животното (mg на kg телесно тегло), изчислявани на седмична основа. Използваната алтернатива трябва да бъде посочена.
31. В случай на въвеждане през устата, животните се третират с изпитвания химикал ежедневно (седем дни в седмицата, всяка седмица), обикновено за период от 12 месеца (вж. също точка 33), макар че според нормативните изисквания може да се изисква и по-голяма продължителност. Необходимо е да се обосновават причините за използването на всякакъв друг режим на дозиране, например пет дни в седмицата. В случай на прилагане по дермален път животните обичайно са третирани с изпитвания химикал в продължение на най-малко 6 часа в денонощието, 7 дни в седмицата, както е определено в глава Б.9 от настоящото приложение (10), за период от 12 месеца. Експозицията по инхалаторен път се извършва в продължение на 6 часа в денонощието, 7 дни в седмицата, но експозиция за 5 дни седмично също може да бъде прилагана, ако е обоснована. Периодът на експозицията по принцип е с продължителност от 12 месеца. Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Трябва да бъде предоставена обосновка при използване на продължителност на експозицията по-малка от 6 часа дневно. Вж. също глава Б.8 от настоящото приложение (8).
32. Когато изпитваният химикал се прилага чрез сонда на животните, това следва да се извърши посредством стомашна тръбичка или подходяща канюла за интубация, по едно и също време всеки ден. Обикновено еднократната доза се прилага веднъж дневно, но когато например даден химикал е местен дразнител, може да е възможно поддържането на ежедневната доза да се извършва чрез прилагането ѝ като разделена доза (два пъти дневно). Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Обемът следва да се запазва възможно най-нисък и по принцип не следва да надхвърля 1 ml/100 g телесно тегло за гризачи (22). Варирането на обема за изпитването следва да бъде сведено до минимум чрез настройване на концентрацията така, че да се осигури постоянен обем при всички нива на доза. Потенциално корозивните или дразнещи химикали са изключение и трябва да бъдат разредени, за да се избегнат силни локални ефекти. Изпитването при концентрации, за които съществува вероятност да причиняват корозивно или дразнещо действие върху стомашно-чревния тракт, следва да се избягва.

#### **Продължителност на изпитването**

33. Настоящият метод за изпитване е планиран предимно като 12-месечно изследване за хронична токсичност, като планът на изследването допуска също така, и може да бъде прилаган или за изследвания с по-малка продължителност (напр. 6 или 9 месеца), или за такива с по-голяма (напр. 18 или 24 месеца), в зависимост от изискванията на специфичната нормативна уредба или за конкретни механистични цели. Отклоненията от продължителността на експозиция от 12 месеца трябва да бъдат обосновани, особено в случаите с по-кратка продължителност. Сателитните групи, включени за мониторинг на обратимостта на всякакви токсикологични промени, индуцирани от изпитвания химикал, предмет на проучването, следва да бъдат оставени без дозиране за период не по-кратък от 4 седмици и не по-дълъг от една трета от общата продължителност на изследването след приключването на експозицията. Допълнителни насоки, включително разглеждането на преживяемостта в изследването, са представени в Ръководство № 116 (6).

## НАБЛЮДЕНИЯ

34. Всички животни трябва да бъдат проверени за заболяемост или смъртност, обикновено в началото и в края на всеки ден, включително в съботни и неделни дни и празници. Поне един път на ден се правят общи клинични наблюдения, за предпочитане по едно и също време, като се взема предвид периодът с пикови стойности на очакваните въздействия след получаване на дозата в случаите на прилагане чрез хранене през сонда.
35. Следва да се провеждат подробни клинични наблюдения на всички животни най-малко веднъж преди първата експозиция (за да се даде възможност за интрасубектни сравнения), в края на първата седмица на изследването и месечно след това. Протоколът от наблюденията трябва да бъде изготвен така, че колебанията на стойностите между извършващите наблюденията да са сведени до минимум и да са независими от изпитваната група. Тези наблюдения следва да се правят извън клетката, която обитава животното, за предпочитане в стандартна обстановка и във всички случаи по едно и също време. Тези наблюдения следва да се описват внимателно, за предпочитане с използване на точкови системи, изрично определени от лабораторията, извършваща изпитвания. Трябва да бъде направено усилие да се осигурят минимални колебания в условията за наблюдение. Отбелязваните симптоми следва да включват, но не и да се ограничат до промяна в кожата, козината, очите, мукозните мембрани (лигавиците), поява на секрета и екскреция, както и автономна активност (напр. съзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците и необичаен начин на дишане). Следва да се записват също и изменения в походката, стойката и реакцията при боравене, както и наличието на клонични или тонични движения, стереотипно (например прекомерно поддържане на външния вид, повтарящо се обикаляне в кръг) или необичайно поведение (например самоосакатяване, вървене назад) (24).
36. Преди първото прилагане на изпитвания химикал на всички животни следва да бъдат извършени офталмологични изследвания с използване на офталмоскоп или друго подходящо устройство. За предпочитане е, при прекратяване на изследването, това изследване да се проведе върху всички животни, но най-малко върху групите, експонирани на високата доза, и върху контролните групи. Ако се открият свързани с третирането изменения в очите, всички животни трябва да бъдат изследвани. Ако от структурен анализ или от друга информация се предполага токсичност за очите, тогава честотата на изследванията на очите следва да бъде увеличена.
37. За химикали, за които в предходни 28-дневни и/или 90-дневни изпитвания за токсичност с повтаряща се доза има показания за потенциал за предизвикване на невротоксични ефекти, като опция изследвания на сензорната реактивност към различни видове стимули (24) (напр. слухови, зрителни и проприоцептивни) (25) (26) (27), оценка на силата на захвата (28) и на двигателната активност (29) могат да бъдат извършени преди започването на изследването и на 3-месечни периоди след началото на изследването, включително до изтичане на 12 месеца, както и при прекратяване на изследването (ако продължителността му е над 12 месеца). Допълнителни уточнения по процедурите, които могат да бъдат следвани, са дадени в съответните препратки. Въпреки всичко могат да се използват и алтернативни процедури, различни от тези, към които се препраща.
38. За химикали, за които в предходни 28-дневни и/или 90-дневни изпитвания за токсичност с повтаряща се доза има показания за потенциал за предизвикване на имунотоксични ефекти, като опция по-нататъшни проучвания на тази крайна точка могат да бъдат извършени при прекратяването.

**Телесно тегло, консумация на храна/вода и усвояване на храната**

39. Всички животни трябва да бъдат претегляни в началото на третирането, след това най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Измерването на консумацията на храна и на усвояването на храната следва да се извършва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Консумацията на вода трябва да се измерва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно, ако химикалът се прилага чрез питейната вода. Измервания на консумацията на вода също следва да бъдат предвидени при изследвания, при които питейната активност се изменя.

**Хематология и клинична биохимия**

40. При изследвания, включващи гризачи, трябва да се извършват хематологични проучвания върху поне 10 мъжки и 10 женски животни на група, на 3, 6 и 12 месеца, както и при прекратяването на изследването (ако е по-дълго от 12 месеца), като през цялото време се използват същите животни. При мишките може да са необходими сателитни животни за осъществяването на всички изисквани хематологични определяния (вж. точка 18). При изследвания с използване на животни, различни от гризачи, се вземат проби от по-малък брой животни (например 4 животни от пол за група при изследвания с използване на кучета), на междинни времена на пробовземане и при прекратяване на изпитването, както е описано за гризачите. Измервания на 3 месеца, както при гризачи, така и при животни, различни от гризачи, не е необходимо да се провеждат, ако в предходно 90-дневно изследване, проведено при сравними нива на доза, не е наблюдавано въздействие върху хематологичните параметри. Кръвните проби се вземат от избран обект, например чрез сърдечна пункция, или от ретроорбиталния синус, под упойка.
41. Параметрите от следния списък следва да бъдат изследвани (30): Общ и диференциален брой левкоцити, брой на еритроцитите, брой на тромбоцитите, концентрация на хемоглобин, хематокрит, среден обем на еритроцитите (MCV), средно съдържание на хемоглобин (MCH), средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите (MCHC), протромбиново време и активирано парциално тромбoplastиново време. Други хематологични параметри, като телца на Heinz или друга нетипична морфология на еритроцити или метхемоглобин, могат да бъдат измервани според случая в зависимост от токсичността на изпитвания химикал. Като цяло следва да се възприеме гъвкав подход, в зависимост от наблюдаваното и/или очакваното въздействие от даден изпитван химикал. Ако изпитваният химикал оказва влияние върху кръвотворната система, изследвания на броя на ретикулоцитите и цитологията на костния мозък може също така да бъдат необходими, макар че не е нужно същите да се провеждат рутинно.



42. Клиничните биохимични определяния за проучване на главните токсични ефекти върху тъканите, и по-специално върху бъбреците и черния дроб, следва да се извършват върху кръвни проби, получени от поне 10 мъжки и 10 женски животни от група в интервали от време, идентични с интервалите при хематологичните изследвания, като през цялото време се използват същите животни. При мишките може да са необходими сателитни животни за осъществяването на всички изисквани клинични биохимични определяния. При изследвания с използване на животни, различни от гризачи, се вземат проби от по-малък брой животни (например 4 животни от пол за група при изследвания с използване на кучета), на междинни времена на пробовземане и при прекратяване на изпитването, както е описано за гризачите. Измервания на 3 месеца, както при гризачи, така и при животни, различни от гризачи, не е необходимо да се провеждат, ако в предходно 90-дневно изследване, проведено при сравними нива на доза, не е наблюдавано въздействие върху клиничните биохимични параметри. Препоръчва се гладуване през нощта за животните (с изключение на мишки) преди вземането на кръвните проби. Трябва да бъдат изследвани параметрите от следния списък (30): глюкоза, уреа (азот в уреа), креатинин, общо белтъци, албумин, калций, натрий, калий, общо холестерол, най-малко две подходящи изпитвания за хепатоцелуларна оценка (аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, глутаматдеhidрогеназа, общо жлъчни киселини) (31) и най-малко две подходящи изпитвания за хепатобилиарна оценка (алкална фосфатаза, гама-глутамилтрансфераза, 5'-нуклеотидаза, общо билирубин, общо жлъчни киселини) (31). Други клинични химични параметри, като триглицериди на гладно, специфични хормони и холинстераза, могат да бъдат измервани според случая в зависимост от токсичността на изпитвания химикал. Като цяло е необходим гъвкав подход, в зависимост от наблюдаваното и/или очакваното въздействие от даден изпитван химикал.
43. Изследвания на урината следва да се извършат най-малко на 10 мъжки и 10 женски животни от група чрез проби, събрани през същите интервали, както за хематологичните и клиничните химични изследвания. Измервания на 3 месеца не е необходимо да се провеждат, ако в предходно 90-дневно изследване, проведено при сравними нива на доза, не е наблюдавано въздействие върху изследванията на урина. Следният списък с параметри е бил включен в експертна препоръка относно изследванията на клиничната патология (30): външен вид, обем, осмолалност или относителна плътност, рН, общо белтъци и глюкоза. Други определяния включват кетон, уробилиноген, билирубин и скрити кръвоизливи. Когато е необходимо, с оглед разширяване на проучването върху наблюдаваните въздействия, могат да се използват и допълнителни параметри.
44. Като цяло се счита, че базовите хематологични и клинични биохимични променливи са необходими преди третиране при изследвания с кучета, но не е необходимо да се определят при изследвания с гризачи (30). Ако обаче базовите данни от минали периоди (вж. точка 50) са неподходящи, следва да се обмисли генериране на такива данни.

### Патология

#### Макроскопска аутопсия

45. Всички животни, подложени на изследване, по принцип са обект на пълна, подробна макроскопска аутопсия, която включва внимателен преглед на външната повърхност на тялото, всички отвори и черепната, гръдната и коремната кухини и тяхното съдържание. Въпреки това също така може да бъде предвидено (при междинните умъртвявания или сателитните групи) измерванията да се ограничат до специални ключови мерки, като невро-токсичност или имунотоксичност (вж. точка 19). Тези животни не следва да се подлагат на аутопсия и следващите аутопсията процедури, описани в следващите точки. За животните от индикаторната група може да се изисква аутопсия за всеки отделен случай, по преценка на ръководителя на изследването.
46. Теглото на органите следва да се измерва при всички животни, различни от изключените по последната част от точка 45. Надбъбречните жлези, мозъкът, епидидимите, сърцето, бъбреците, черният дроб, яйчниците, далакът, тестисите, щитовидната жлеза (претеглена след фиксиране, с околощитовидни жлези), и матката на всички животни (освен тези, които са намерени умиращи и/или междувременно умъртвени) следва да бъдат почистени от каквато и да е допълнителна тъкан, според случая, и да бъде установено мокротото им тегло възможно най-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването им. При изследвания с използване на мишки претеглянето на надбъбречните жлези е по избор.
47. Следните тъкани следва да бъдат консервирани в среда за фиксиране, най-подходяща както за вида тъкан, така и за очакваното последващо хистопатологично изследване (32) (тъканите в средни скоби са по избор):

всички макроскопски увреждания	сърце	панкреас	стомах (предстомах, жлезист стомах)
надбъбречна жлеза	илеум	околощитовидна жлеза	[зъби]
аорта	празно черво	периферен нерв	тестис
мозък (включително срезове от главния мозък, малкия мозък и моста)	бъбреци	хипофиза	тимус
цекум	слъзна жлеза (клепачна)	простатна жлеза	щитовидна жлеза
шийка на матката	черен дроб	право черво	[език]

коагулираща жлеза	бял дроб	спюнчена жлеза	трахея
колон	лимфни възли (както повърхностни, така и дълбоки)	семенно мехурче	пикочен мехур
дванадесетопръстник	млечна жлеза (задължителна за женските и — ако очевидно може да им бъде извършена дисекция — от мъжките)	скелетен мускул	матка (включително шийката)
епидидим	[горни дихателни пътища, включително нос, спирални кости на носа и допълнителни околоносни кухини]	кожа	[уретер]
око (включително ретина)	хранопровод	гръбначен мозък (на три нива: шийно, гръдно и поясно ниво)	[уретра]
[бедрена кост и става]	[обонятелна луковица]	далак	влагалище
жлъчен мехур (за видове, различни от плъх)	яйчници	[гръдна кост]	срез от костен мозък и/или костномозъчен аспират, прясно фиксиран
Хардцова жлеза			

В случай на чифтен орган, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се консервират и двата органа. Клиничните и другите находки могат да посочат необходимостта от изследвания на допълнителни тъкани. Също така всички органи, които на основата на познатите свойства на изпитвания химикал се считат за вероятни прицелни органи, също следва да бъдат консервирани. При изследвания, включващи дермален път на прилагане, следва да бъдат консервирани органите, посочени в списъка за прилагане по орален път, като специфично вземане на проби и консервиране на кожа от мястото на прилагане е от съществено значение. При изследвания по инхалаторен път списъкът с тъканите от дихателните пътища за консервиране и изследване следва да е в съответствие с препоръките от глави Б.8. от настоящото приложение (8) и Б.29. от настоящото приложение (9). По отношение на други органи/тъкани (и в допълнение към специално консервираните тъкани от дихателните пътища) органите, които следва да бъдат изследвани, са посочени в списъка за прилагане по орален път.

#### Хистопатология

48. Достъпни са насоки относно най-до брите практики при провеждането на изследвания на токсикологичната патология (32). Минималните хистопатологични изследвания следва да бъдат:

- всички тъкани от животните от групата с висока доза и от контролната група;
- всички тъкани от животните, които са в терминално състояние или са умъртвени по време на изследването;
- всички тъкани, при които се наблюдават макроскопски аномалии;
- прицелните тъкани или тъканите, които в групата с най-висока доза са показали свързани с третирането изменения, от всички животни във всички групи с доза, различна от най-високата;
- в случай на чифтен орган, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се изследват и двата органа.

#### ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

##### Данни

49. Следва да бъдат посочени индивидуални данни за животните за всички оценени параметри. Допълнително всички данни следва да се обобщят в таблична форма, показваща за всяка изпитвана група броя на животните при започване на изпитването, броя на животните, които са открити мъртви по време на изследването или са били умъртвени по хуманни причини, и времето на смъртта или умъртвяването по хуманни причини, броя на животните с проявени признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето на започването, продължителността и силата на всички токсични въздействия, броя на животните с увреждания, типа на уврежданията и процента на животните, показващи всеки отделен тип увреждане. В таблици с обобщени данни следва да се посочат средните стойности и стандартните отклонения (за непрекъснатите данни от изпитвания) при животни, показващи токсично въздействие или при които са налице увреждания, в допълнение към степенуването на уврежданията.

50. Контролните данни за минали периоди могат да бъдат полезни при интерпретирането на резултатите от изследването, например в случай, когато има признаци, че данните, предоставени от паралелни контроли, показват съществено несъответствие при сравнение с актуални данни от контролни животни от една и съща извършваща изпитвания лаборатория/колония. Ако контролните данни за минали периоди са оценени, следва да се представят от същата лаборатория, да се отнасят за животни на една и съща възраст и от една и съща порода, и да са генерирани през петте години, предхождащи съответното изследване.
51. Където е приложимо, числовите резултати следва да се оценяват чрез използване на подходящ и общоприет статистически метод. Статистическите методи и данните, които следва да се анализират, трябва да се избират по време на планирането на изследването (точка 8). Изборът трябва да предвижда възможност за корекция за преживяемост, ако е необходимо.

#### **Доклад от изпитването**

52. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

##### *Изпитван химикал:*

- физическа природа, чистота и физични и химични свойства;
- данни за идентифициране на химикала;
- източник на химикала;
- номер на партидата;
- сертификат за химичен анализ.

##### *Носител (когато се използва такъв):*

- обосновка за избора на носител (когато носителът е различен от вода).

##### *Изпитвани животни:*

- използван вид/порода и обосновка за направения избор;
- брой, възраст и пол на животните в началото на изпитването;
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването.

##### *Условия на изпитването:*

- обосновка за пътя на прилагане и избора на доза;
- когато е приложимо, използваните статистически методи за анализ на данните;
- подробна информация за състава на изпитвания химикал/изготвянето на хранителния режим;
- аналитични данни за достигната концентрация, стабилност и хомогенност на сместа;
- път на прилагане и подробна информация за прилагането на изпитвания химикал;
- за изследвания по инхалаторен път, дали е само през носа, или на цялото тяло;
- действителните дози (mg на kg телесно тегло дневно) и коефициент на превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода (mg на kg или ppm) в действителна доза, ако е приложимо;
- подробна информация за качеството на храната и водата за пиене.

Резултати (следва да се представят обобщени таблични данни и индивидуални данни за животните):

- данни за преживяемостта;
- телесно тегло/промени в телесното тегло;
- консумация на храна, изчисления на усвояването на храната, ако са извършени, и потребление на вода, ако е приложимо;
- данни относно отговор на токсичност според пол и ниво на доза, включително симптоми на токсичност;
- природа, случаи на клинични наблюдения (и ако е използвана точкова система — сила) и продължителност на клиничните наблюдения (независимо обратими или необратими);
- резултатите от офталмологичните изследвания;
- хематологични изпитвания;
- клинични биохимични изпитвания;
- изследвания на урина;
- резултати от всякакви изследвания за невротоксичност или имунотоксичност;
- телесната маса при настъпване на смъртта;
- тегло на органите (и техните съотношения, ако е приложимо);
- находки при аутопсията;
- подробно описание на всички свързани с третирането хистопатологични находки;
- данни за абсорбция, ако са налични.

Статистическа обработка на резултатите, където е приложимо

Обсъждане на резултатите, включително:

- Зависимости доза-ефект
- Разглеждане на всякаква информация, свързана с начин на действие
- Обсъждане на всякакви подходи за моделиране
- Определяне на BMD, NOAEL или LOAEL
- Контролни данни за минали периоди
- Относителност към човека

Заклучения

#### ПРЕПРАТКИ:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

- (3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145-191.
- (4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.
- (5) Глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“).
- (6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment № 116, available on the OECD public website for Test Guideline at [www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines).
- (7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (8) Глава Б.8 от настоящото приложение („Субакутна инхалаторна токсичност: 28-дневно изследване“).
- (9) Глава Б.29 от настоящото приложение („Субхронична инхалаторна токсичност: 90-дневно изследване“).
- (10) Глава Б.9 от настоящото приложение („Токсичност (дермална) с многократни дози (28 дни)“).
- (11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment № 35 and Series on Pesticides № 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit. Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 - 837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication № 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

- 
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document № 60.
- (25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) (Проект на) документ на Европейска агенция по лекарствата „Неклинични насоки относно хепатотоксичността, индуцирана от лекарствени продукти“ (док. № EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Изпитван химикал:** Всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.“

6) Глави Б.32 и Б.33 се заменят със следното:

**„Б.32. ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА КАНЦЕРОГЕННОСТ**

## УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 451 на ОИСП (ОИСП TG 451) (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване 451 е прието през 1981 г. Разработването на този преработен метод Б.32 беше сметнено за необходимо, за да бъдат отразени последните достижения в областта на хуманното отношение към животните и нормативните изисквания (2) (3) (4) (5) (6). Актуализирането на настоящия метод за изпитване Б.32 е проведено успоредно с преразглеждането на глава Б.30 („Изследване за хронична токсичност“) и глава Б.33 от настоящото приложение („Комбинирано изследване за хронична токсичност/канцерогенност“) от настоящото приложение, и с цел получаване на допълнителна информация от животните, използвани в изследването, и предоставяне на допълнителна подробна информация относно избора на доза. Настоящият метод за изпитване Б.32 е разработен за използване при изпитвания на широк кръг от химикали, включително пестициди и промишлени химикали. Следва да се отбележи обаче, че някои подробности и изисквания могат да се различават по отношение на лекарствените средства (вж. Насока S1B на Международната конференция по хармонизация (ICH) относно изпитване за канцерогенност на фармацевтични продукти).
2. По-голямата част от изследванията за канцерогенност се извършват върху различни видове гризачи и следователно настоящият метод за изпитване е предназначен да се прилага основно за изследвания, провеждани върху тези видове. Ако за такива изследвания се изисква използване на видове, различни от гризачи, следва да се прилагат, с подходящи изменения, принципите и процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, заедно с тези, разгледани в глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“) (6). Допълнителни насоки са налични в Ръководство на ОИСП № 116 за планиране и провеждане на изследвания за хронична токсичност и за канцерогенност (7).
3. Трите основни пътя на прилагане, използвани при изследванията за канцерогенност, са орален, дермален и инхалационен. Изборът на път на прилагане зависи от физичните и химичните характеристики на изпитвания химикал и от преобладаващия път на експозиция при хора. Допълнителна информация за избора на път на експозиция е представена в Ръководство № 116 (7).
4. Настоящият метод за изпитване е съсредоточен върху експозицията по орален път — най-често използваният път в изследванията за канцерогенност. Макар че изследванията за канцерогенност, включващи експозиция по дермален или инхалационен път, могат също да бъдат необходими за оценка на риска за човешкото здраве и/или могат да бъдат изисквани по силата на някои нормативни уредби, посочените два пътя на експозиция са със значителна техническа сложност. Такива изследвания трябва да се планират за всеки конкретен случай, въпреки че методът за изпитване за оценка на канцерогенността чрез прилагане по орален път би могъл да послужи за основа на протокол за изследвания, включващи инхалационен и/или дермален път, по отношение на препоръките за периодите за третиране, клиничните параметри и параметрите на патологията, и други. Налични са указания на ОИСП за прилагане на изпитвани химикали по дермален (7) и инхалационен път (7) (8). Глава Б.8 от настоящото приложение (9) и глава Б.29 от настоящото приложение (10), заедно с Ръководство на ОИСП за изпитване за остра инхалаторна токсичност (8), следва специално да бъдат консултирани при планирането на по-дългосрочни проучвания, включващи експозиция по инхалационен път. Глава В.9 от настоящото приложение (11), следва да бъде консултирана в случай на изпитване, провеждано по дермален път.
5. Изследването за канцерогенност предоставя информация за възможните рискове за здравето, произтичащи по всяка вероятност от повтаряща се експозиция за период, стигащ до продължителността на живота на вида, който се използва при изследването. Изследването предоставя информация за токсичните ефекти на изпитвания химикал, включително потенциална канцерогенност, и може да посочва прицелните органи и възможността за акумулиране. То може да предостави оценка на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект за токсични ефекти и — в случаите с канцерогени, различни от генотоксичните — за туморни отговори, което може да бъде използвано за установяване на критерии за безопасност при експозиция на хора. Набляга се и върху нуждата от обстойни клинични наблюдения, правени над животни с цел да се получи колкото е възможно повече информация.
6. Целите на изследванията за канцерогенност, обхванати от настоящия метод за изпитване, включват:
  - идентифициране на канцерогенните свойства на даден изпитван химикал, водещи до по-честа поява на тумори, по-голям пропорционален дял на злокачествените тумори, или до намаляване на времето за поява на тумори в сравнение с паралелни контролни групи,
  - идентифициране на прицелния(те) орган(и) за канцерогенността,
  - идентифициране на времето за поява на тумори,

- характеризирани на зависимостта доза-отговор при тумори,
- идентификация на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) или на отправната точка за установяване на еталонна доза (BMD),
- екстраполация на канцерогенните ефекти за експозиция на човека при ниски нива на доза,
- предоставяне на данни на изпитване на хипотези относно начина на действие (2) (7) (12) (13) (14) (15).

#### ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

7. При оценката на потенциалната канцерогенност на даден изпитван химикал цялата достъпна информация за изпитвания химикал следва да бъде разглеждана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждането на изследването, с цел да се съсредоточи планът на изследването върху по-ефикасно изпитване на потенциала за канцерогенност и свеждане до минимум използването на животни. Информацията за и разглеждането на начина на действие на предполагаемия канцероген (2) (7) (12) (13) (14) (15) е от особено значение, тъй като оптималният план може да се различава в зависимост от това дали изпитваният химикал е известен или предполагаем генотоксичен канцероген. Допълнителни насоки относно разглеждането на начина на действие могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7).
8. Информация, която ще помогне за съставянето на план на изследването, включва идентичност, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; резултатите от всякакви извършени *in vitro* или *in vivo* изпитвания за токсичност, включително изпитвания за генотоксичност; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност, мутагенност/генотоксичност, канцерогенност и други токсикологични данни за химикали със сходна структура; достъпни токсикокинетични данни (данни за кинетика на еднократна, а също и на повтаряща се доза, където са достъпни) и данни, получени от други изследвания с повтаряща се експозиция. Оценката на канцерогенността трябва да се извършва след получаване на първоначална информация относно токсичността от 28-дневно и/или 90-дневно изпитвания за токсичност при повтаряща се доза. Краткосрочни изпитвания за зараждане и размножение на ракови клетки също така биха могли да предоставят полезна информация. Поетапният подход за изпитване за канцерогенност следва да се разглежда като част от цялостната оценка на възможните неблагоприятни въздействия на даден изпитван химикал върху здравето (16) (17) (18) (19).
9. Статистическите методи, които са най-подходящи за анализ на резултатите, като се имат предвид планът на изследването и целите, следва да бъдат определени преди началото на изследването. Въпроси за разглеждане включват дали статистиката следва да включва корекция за преживяемост, анализ на кумулативни рискове от тумори, свързани с продължителността на преживяемостта, анализ на времето до образуване на тумора и анализ в случай на преждевременно прекратяване на използването на една или повече групи. Насоки относно подходящите статистически анализи и ключови препратки към международно приети статистически методи са дадени в Ръководство № 116 (7), също и в Ръководство № 35 за анализ и оценка на изследвания за хронична токсичност и канцерогенност (20).
10. При провеждане на изследването за канцерогенност ръководните принципи и съображенията, формулирани в Ръководство № 19 на ОИСП относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността (21), и по-специално точка 62 от него, следва винаги да бъдат спазвани. В тази точка е посочено, че „при изследвания, включващи прилагане на повтарящи се дози, когато дадено животно показва клинични признаци, които са прогресивни, водещи до по-нататъшно влошаване на състоянието, следва да се вземе информлирано решение дали да се разреши или не животното да бъде ултървено по хуманен начин. Решението следва да включва съображение относно стойността на информацията, която ще бъде получена от продължаване на изследването с даденото животно във връзка с общото му състояние. Ако се вземе решение за продължаване на изпитването с животното, честотата на наблюденията трябва да се увеличи доколкото е необходимо. Би било възможно също така, без да се засяга неблагоприятно целта на изпитването, временно да бъде преустановено дозирането, ако това ще допринесе за премахване на болката или дистреса, или да бъде намалена дозата на изпитването.“
11. Подробни насоки относно и обсъждане на принципите на избора на доза за изследванията за хронична токсичност и канцерогенност могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7), както и в две публикации на Международния институт за науките за живота (22) (23). Основната стратегия за избор на доза зависи от основната цел или цели на изследването (точка 6). При избора на подходящи нива на доза следва да се постигне равновесие между скрининга за опасност, от една страна, и характеризирането на отговорите на ниски дози и тяхната уместност, от друга страна. Това важи особено за случаите, в които следва да се проведе комбинирано изследване за хронична токсичност и за канцерогенност (глава Б.33 от настоящото приложение) (точка 12).
12. Следва да се разгледа възможността за провеждане на комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност (глава Б.33 от настоящото приложение), вместо отделно провеждане на изследване за хронична токсичност (глава Б.30 от настоящото приложение) и на изследване за канцерогенност (настоящият метод за изпитване Б.32). Комбинираното изпитване осигурява по-голяма ефикасност по отношение на време и разходи в сравнение с провеждането на две отделни изследвания, без да се прави компромис с качеството на данните нито във фазата на изпитване за хронична токсичност, нито във фазата за канцерогенността. Следва обаче да се обърне внимание на принципите на избора на доза (точка 11 и 22—25), когато се предприема комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност (глава Б.33 от настоящото приложение), и също така се признава, че по някои нормативни уредби може да се изискват отделни изследвания.



13. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в края на тази глава и в Ръководство № 116 (7).

#### ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

14. Изпитваният химикал се прилага ежедневно, в постепенно нарастващи дози, на няколко групи изпитвани животни за по-голямата част от живота им, обикновено по орален път. Изпитване по инхалаторен или дермален път може също да е подходящо. Животните се наблюдават отблизо за признаци на токсичност и за развитието на отнасящи се до новообразувания увреждания. Животните, които умират или са умъртвени по време на изпитването, се аутопсират, а преживелите животни се умъртвяват и се аутопсират при приключването на изпитването.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Избор на животински вид

15. Настоящият метод за изпитване основно обхваща оценка на канцерогенността при гризачи (вж. точка 2). Използването на видове, различни от гризачи, може да бъде разглеждано, когато наличните данни показват, че те са подходящи за прогнозиране на последиците за здравето на човека. Изборът на вида следва да се обоснове. Предпочитаният вид е плъхът, въпреки че могат да се използват и други видове от гризачи, например мишки. Въпреки че използването на мишки в провеждането на изпитвания за канцерогенност може да има ограничена полезност (24) (25) (26), при някои настоящи регулаторни програми все още се изисква изпитване за канцерогенност при мишки, освен ако се установи, че подобно проучване не е необходимо от научна гледна точка. Плъховете и мишките са предпочитани опитни модели поради тяхната относително кратка продължителност на живота, широкото им използване при фармакологични и токсикологични изследвания, тяхната склонност към образуване на тумори, както и наличието на достатъчно характеризирани породи. В резултат на тези характеристики е налично голямо количество информация относно тяхната физиология и патология. Допълнителна информация за избора на вид и порода е представена в Ръководство № 116 (7).
16. Следва да се използват здрави млади полово зрели животни от обичайно използваните за лабораторни изследвания породи. Изследването за канцерогенност трябва да се провежда върху животни от една и съща порода и източник като тези, които са използвани при предварителното(ите) изследване(ия) за токсичност с по-малка продължителност, но ако за животни от тази порода и източник е известно, че могат да причинят проблеми при постигането на обичайно признатите критерии за преживяемост при дългосрочни изследвания [вж. Ръководство № 116 (7)], следва да се разгледа възможността за използването на порода на животно, която има приемлив процент на преживяемост за дългосрочното изследване. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни.

##### Условия на отглеждане и хранене

17. Животните могат да бъдат настанени в клетките индивидуално или на малки групи от един и същ пол; индивидуалното настаняване следва да се разглежда само ако е научно обосновано (27) (28) (29). Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C ( $\pm$  3 °C). Въпреки че относителната влажност трябва да е най-малко 30 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението, целта следва да е 50—60 %. Осветлението следва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Хранителният режим следва да отговаря на всички изисквания към храната за съответния изпитван вид, а съдържанието в храната на замърсители, включващи, но без да се ограничават до остатъци от пестициди, устойчиви органични замърсители, фитоестрогени, тежки метали и микотоксини, които биха могли да окажат въздействие върху резултата от изпитването, трябва да е възможно най-ниско. Следва периодично да се генерира аналитична информация относно равнищата на хранителните вещества и замърсителите в хранителния режим, най-малко в началото на изследването и когато има промяна в използваната партида, и същата следва да бъде включена в окончателния доклад. По подобен начин следва да бъде предоставена аналитична информация за питейната вода, използвана в изследването. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от необходимостта да се осигури подходящо смесване с изпитвания химикал и да бъдат изпълнени изискванията за хранене на животните, когато изпитваният химикал се прилага чрез хранителния режим.

##### Подготовка на животните

18. Следва да се използват здрави животни, които предварително са се аклиматизирали към лабораторните условия в продължение най-малко на 7 дни и върху които не са извършвани предходни опитни процедури. При гризачите дозирането на животните следва да започне колкото е възможно по-скоро след отбиването и аклиматизацията и, за предпочитане, преди животните да навършат 8 седмици. Опитните животни трябва да се опишат по отношение на вид, порода, източник за доставка, пол, телесно тегло и възраст. При започване на изследването колебанието на индивидуалните стойности на телесното тегло на използваните животни трябва да бъде минимално и да не превишава  $\pm$  20 % от средното тегло на всички животни от същия пол в рамките на изследването. Животните се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за третиране. След прилагането на подбора на случаен принцип следва да няма значителни разлики между средните стойности на телесното тегло в отделните групи в рамките на съответния пол. Ако съществуват статистически значими разлики, тогава стъпката по подбор на случаен принцип трябва да се повтори, ако е възможно. За всяко животно се определя уникален идентификационен номер и му се поставя постоянна маркировка с този номер чрез поставяне на татуировка, имплантиране на микрочип или чрез друг подходящ метод.

**ПРОЦЕДУРА****Брой и пол на животните**

19. Следва да се използват и двата пола. Трябва да се използва брой животни, който е достатъчен да направи възможно извършването на задълбочена биологична и статистическа оценка. Следователно всяка група с определена доза и всяка и паралелна контролна група трябва да съдържат най-малко по 50 животни от всеки пол. В зависимост от целта на изследването може да бъде възможно увеличаване на статистическата мощност на ключовите оценки чрез диференцирано неравномерно разпределяне на животни по групите с различни дози, с повече от 50 животни в групите с ниски дози; например, за определяне на канцерогенен потенциал при ниски дози. Следва да се признае обаче, че умерено увеличение на размера на групата ще доведе до относително слабо нарастване на статистическата мощност на изследването. Допълнителна информация относно статистическия план на изследването и избора на нива на доза за максимизиране на статистическата мощност се дава в Ръководство № 116 (7).

**Планиране на междинни умъртвявания и сателитни групи (индикаторни групи)**

20. Проучването може да предвижда междинни умъртвявания, например на 12 месеца, за предоставяне на информация за напредването на отнасящи се до новообразувания изменения и механистична информация, ако е научно обосновано. Когато такава информация вече е достъпна от предходни изследвания на изпитвания химикал за токсичност при повтарящи се дози, възможно е междинните умъртвявания да не са научно обосновани. Ако в плана на изследването са включени междинни умъртвявания, броят на животните във всяка група с определена доза, определени за междинно умъртвяване, обичайно е 10 животни от пол, и общият брой животни, включени в плана на изследването, трябва да бъде увеличен с броя животни, които са планирани за междинно умъртвяване преди края на изследването. Допълнителна индикаторна група от животни (обикновено по 5 животни от всеки от двата пола) може да бъде включена, за мониторинг на здравния статус по време на изследването, ако е необходимо (30). По-нататъшни насоки са предоставени в Ръководство № 116 (7).

**Групи с определени дози и дозиране**

21. Насоки по всички аспекти на избора на доза и интервалите между нивата на доза са предоставени в Ръководство № 116 (7). Следва да се приложат най-малко три нива на доза и да се използва паралелна контролна група. Нивата на доза обичайно са основани на резултатите от по-краткосрочни изследвания при повтаряща се доза, или на изследвания за определяне на обхвата, и следва да са съобразени с всякакви достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него химикали.
22. Освен ако не е ограничено от физичното или химичното естество, или от биологичните ефекти на изпитвания химикал, най-високото ниво на доза следва да се избере така, че да се установят основните прицелни органи и токсични ефекти, като същевременно се избягва страдание, силна токсичност, заболяемост или смърт. Като се вземат предвид факторите, изложени в точка 23 по-долу, най-високото ниво на доза трябва да бъде избрано така, че да предизвиква признаци на токсичност, доказвани например с потискане на даването на тегло (около 10 %). Въпреки това, в зависимост от целите на изследването (вж. точка 6), може да бъде избрана максимална доза, която да е по-ниска от дозата, доказваща наличието на токсичност, например, ако при дадена доза се проявява неблагоприятен ефект, който дава повод за загриженост, но който има незначително влияние върху продължителността на живота или телесното тегло.
23. Нивата на доза и интервалите между тях могат да бъдат избрани така, че да бъдат установени зависимостта доза-отговор и — в зависимост от начина на действие на изпитвания химикал — NOAEL или други очаквани резултати от изследването, например BMD (вж. точка 25) при най-ниското ниво на доза. Фактори, които следва да бъдат разглеждани при поставянето на по-ниски дози, включват очаквания наклон на кривата доза-отговор, дозите, при които могат да настъпят важни промени в метаболизма или в начина на токсично действие, когато се очаква праг, или когато се очаква отправна точка за екстраполиране на ниски дози.
24. Избраните интервали между нивата на доза зависят от характеристиките на изпитвания химикал и не могат да бъдат предписани в настоящия метод за изпитване, но от двукратни до четирикратни интервали често дават добри параметри на изпитването, когато се използват за определяне на намаляващите нива на доза и добавянето на четвърта група за изпитване често се предпочита пред използване на големи интервали (например с кратност, надвишаваща 6—10 пъти) между дозирането. По принцип използване на кратност над 10 следва да се избягва и, ако се използва, следва да бъде обосновано.
25. Както е допълнително разглеждано в Ръководство № 116 (7), точки, които трябва да бъдат взети предвид при избора на доза, включват:
- познати или предполагаеми нелинейни зависимости или инфлексни точки в зависимостта доза-отговор,
  - токсикокинетика и обхвати на дозиране, при които се получава, или не се получава, метаболитна индукция, насищане или нелинейна зависимост между външни и вътрешни дози,
  - увреждания-прекурсори, маркери на ефект или показатели за протичане в дълбочина на ключови биологични процеси,
  - ключови (или предполагаеми) аспекти на начина на действие, като например дози, при които започва да се проявява цитотоксичност, появяват се нарушения в хормоналните равнища и механизмите на хомеостазата, и др.,

- области от кривата доза-отговор, в които е необходима особено устойчива оценка, напр. в обхвата на очакваната BMD или предполагаем праг,
  - съобразяване на предполагаеми нива на експозиция на човека.
26. Контролната група не се третира или е контролна група за носителя в случаите, когато за въвеждането на изпитвания химикал се използва носител. С изключение на самата обработка с изпитвания химикал, животните в контролната група следва да се третират по същия начин като тези от групите за изпитване. Когато се използва носител, животните от контролната група се третират с най-големия обем носител измежду обемите, при които се третират групите на дози. Ако изпитваният химикал се прилага чрез хранителен режим и причинява значително намаляване на приема на храна поради понижени вкусови качества на хранителния режим, може да бъде полезна допълнителна контролна група, получаваща същото количество храна, която да служи като по-подходяща контрола.

#### Приготвяне на дозите и прилагане на изпитвания химикал

27. Изпитваният химикал обичайно се прилага през устата, чрез хранителния режим или питейната вода, или чрез хранене през сонда. Допълнителна информация за пътища и начини на прилагане е представена в Ръководство № 116 (7). Пътят и начинът на прилагане зависят от целта на изследването, физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, неговата биодостъпност и преобладаващия път и начин на експозиция на хора. Следва да се представи обосновка за избрания път и начин на прилагане. С оглед на хуманното отношение към животните, храненето по орален път през сонда обичайно следва да се избере само за онези агенти, за които този път и начин на прилагане е в разумна степен представителен за потенциалната експозиция на хора (напр. фармацевтични продукти). За химикали, свързани с хранителния режим или с околната среда, включително пестициди, прилагането е обичайно чрез хранителен режим или чрез питейната вода. Въпреки това, при някои сценарии, напр. професионална експозиция, прилагане по други пътища може да бъде по-подходящо.
28. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Трябва да бъдат разгледани следните характеристики на носителя и, съответно, други добавки: ефекти върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържането на изпитвания химикал; ефекти върху химичните свойства на изпитвания химикал, които могат да изменят токсикологичните му характеристики; и ефектите върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това — разтвор/емулсия в масло (напр. царевично олио), а след това — разтваряне в други носители. Когато се използват други носители освен водата, трябва да се познават токсикологичните свойства на носителя. Следва да е достъпна информацията относно стабилността на изпитвания химикал и хомогенността на разтворите за дозиране или на храната (в зависимост от случая) при условията на прилагане (напр. чрез хранителен режим).
29. За химикали, които се прилагат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството изпитван химикал не въздейства върху нормалното хранене и водния баланс. При дългосрочни изследвания за токсичност с прилагане чрез хранителния режим концентрацията на изпитвания химикал в храната по принцип не трябва да надвишава горна граница от 5 % от общото количество храна, с цел да се избегне небалансирано хранене. Когато изпитваният химикал се прилага с храната, може да се използва или постоянна концентрация в храната (mg/kg храна или ppm), или постоянно ниво на доза от гледна точка на телесното тегло на животното (mg на kg телесно тегло), изчислявани на седмична основа. Използваната алтернатива трябва да бъде посочена.
30. В случай на прилагане по орален път дозата изпитван химикал се дава на животните ежедневно (седем дни в седмицата), обикновено за период от 24 месеца за гризачи (вж. също точка 32). Необходимо е да се обосноват причините за използването на всякакъв друг режим на дозиране, например пет дни в седмицата. В случай на прилагане по дермален път животните обичайно са третирани с изпитвания химикал в продължение на най-малко 6 часа в денонощието, 7 дни в седмицата, както е определено в глава Б.9 от настоящото приложение (11), за период от 24 месеца. Експозицията по инхалаторен път се извършва в продължение на 6 часа в денонощието, 7 дни в седмицата, но експозиция за 5 дни седмично също може да бъде прилагана, ако е обоснована. Периодът на експозицията по принцип е с продължителност от 24 месеца. Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Трябва да бъде предоставена обосновка при използване на продължителност на експозицията по-малка от 6 часа дневно. Вж. също глава Б.8 от настоящото приложение (9).
31. Когато изпитваният химикал се прилага чрез сонда на животните, това следва да се извърши посредством стомашна тръбичка или подходяща канюла за интубация, по едно и също време всеки ден. Обикновено еднократната доза се прилага веднъж дневно, но когато например даден химикал е местен дразнител, може да е възможно поддържането на ежедневната доза да се извършва чрез прилагането ѝ като разделена доза (два пъти дневно). Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Обемът следва да се запазва възможно най-нисък и по принцип не следва да надхвърля 1 ml/100 g телесно тегло за гризачи (31). Варирането на обема за изпитването следва да бъде сведено до минимум чрез настройване на концентрацията така, че да се осигури постоянен обем при всички нива на доза. Потенциално корозивните или дразнещи химикали са изключение и трябва да бъдат разредени, за да се избегнат силни локални ефекти. Изпитването при концентрации, за които съществува вероятност да причиняват корозивно или дразнещо действие върху стомашно-чревния тракт, следва да се избягва.

### Продължителност на изпитването

32. Продължителността на изследването обичайно е 24 месеца за гризачи, представляващи по-голямата част от нормалната продължителност на живота на животните, които ще бъдат използвани. По-дълги или по-къси продължителности на изследване могат да бъдат използвани, в зависимост от продължителността на живота на породата от изследвания животински вид, но следва да бъдат обосновани. За конкретни породи мишки, напр. AKR/J, C3H/J или C57BL/6J, продължителност от 18 месеца може да е по-подходяща. Следното също така предоставя някои насоки относно продължителността, прекратяването на изследването и преживяемостта; допълнителни насоки, включително разглеждане на приемливостта на отрицателен резултат от изпитване за канцерогенност, свързан с преживяемостта в изследването, са предоставени в Ръководство на ОИСП № 116 за планиране и провеждане на изследвания за хронична токсичност и за канцерогенност (7).
- Следва да се разгледа възможност за прекратяване на изследването, когато броят на преживелите животни в групите на по-ниски дози или в контролната група спадне под 25 процента.
  - В случая, когато само животните от групата с висока доза умират преждевременно поради токсичност, това не следва да води до прекратяване на изследването.
  - Преживяването на всеки от двата пола трябва да се разглежда отделно.
  - Изследването не следва да бъде продължавано отвъд точката, в която достъпните данни от изследването вече не са достатъчни за даване на възможност за извършване на статистически обоснована оценка.

### НАБЛЮДЕНИЯ

33. Всички животни трябва да бъдат проверявани за заболяемост или смъртност, обикновено в началото и в края на всеки ден, включително в съботни и неделни дни и празници. Животните следва допълнително да бъдат проверявани веднъж на ден за специфични сигнали от токсикологична значимост, като се взема предвид върховият период на очакваните ефекти след получаване на дозата в случай на прилагане чрез хранене през сонда. Специално внимание трябва да се обърне на развитието на тумори: трябва да се регистрират времето на поява, локализацията, размерите, външният вид и развитието на всички тумори, които могат да бъдат видяни и опипани при макроскопско изследване.

#### *Телесно тегло, консумация на храна/вода и усвояване на храната*

34. Всички животни трябва да бъдат претегляни в началото на третирането, след това най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Измерването на консумацията на храна и на усвояването на храната следва да се извършва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Консумацията на вода трябва да се измерва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно, ако химикалтът се прилага чрез питейната вода. Измервания на консумацията на вода също следва да бъдат предвидени при изследвания, при които питейната активност се изменя.

#### *Хематология, клинична биохимия и други изтвървания*

35. С цел получаване на максимално количество информация от изследването, особено относно съображения за начина на действие, по преценка на ръководителя на изследването могат да бъдат взети кръвни проби за хематология и клинична биохимия. Изследване на урината може също да е подходящо. Допълнителни насоки относно стойността на вземането на такива проби като част от изследване за канцерогенност са представени в Ръководство № 116 (7). Ако бъде счетено за целесъобразно, изследвания на кръвни проби за хематология и клинична химия и на урина могат да се провеждат като част от междинно умъртвяване (точка 20) и при прекратяване на изследване, върху минимум 10 животни от пол за група. Кръвните проби се вземат от избран обект, например чрез сърдечна пункция, или от ретроорбиталния синус, под упойка, и следва да се съхраняват при подходящи условия, ако е приложимо. Кръвни натривки може също така да се подготвят за изследване, особено ако костният мозък изглежда да е прицелният орган, въпреки че стойността на това изследване за оценка на канцерогенния/онкогенния потенциал е под съмнение (32).

### ПАТОЛОГИЯ

#### *Макроскопска аутопсия*

36. Всички животни, подложени на изследване, с изключение на животни от индикаторна група (вж. точка 20) и други животни от сателитни групи, следва да бъдат подложени на пълна, подробна макроскопска аутопсия, която включва внимателен преглед на външната повърхност на тялото, всички отвори и черепната, гръдната и коремната кухини и тяхното съдържание. За животни от индикаторна група и други животни от сателитни групи може да се изисква аутопсия въз основа на всеки отделен случай, по преценка на ръководителя на изследването. Претеглянето на органи обичайно не е част от изследването за канцерогенност, тъй като старческите изменения и, на по-късен етап, развитието на тумори, оказват неблагоприятно влияние върху полезността на данните за теглото на отделните органи поради невъзможност за разграничаване. Те обаче могат да бъдат от решаващо значение за извършване на оценка на значимостта на доказателствения материал и особено за съображенията относно начина на действие. Ако са част от сателитно изследване, те следва да бъдат събрани не по-късно от една година след началото на изследването.
37. Следните тъкани следва да бъдат консервирани в среда за фиксиране, най-подходяща както за вида тъкан, така и за очакваното последващо хистопатологично изследване (33) (тъканите в средни скоби са по избор):

всички макроскопски увреждания	сърце	панкреас	стомах (предстомах, жлезист стомах)
надбъбречна жлеза	илеум	околощитовидна жлеза	[зъби]
аорта	празно черво	периферен нерв	тестис
мозък (включително срезове от главния мозък, малкия мозък и моста)	бъбреци	хипофиза	тимус
цекум	слъзна жлеза (клепачна)	простатна жлеза	щитовидна жлеза
шийка на матката	черен дроб	право черво	[език]
коагулираща жлеза	бял дроб	слюнчена жлеза	трахея
колон	лимфни възли (както повърхностни, така и дълбоки)	семенно мехурче	пикочен мехур
дванадесетопръстник	млечна жлеза (задължителна за женските и — ако очевидно може да им бъде извършена дисекция — от мъжките)	скелетен мускул	матка (включително шийката)
епидидим	[горни дихателни пътища, включително нос, спирални кости на носа и допълнителни околоносни кухини]	кожа	[уретер]
око (включително ретина)	хранопровод	гръбначен мозък (на три нива: шийно, гръдно и поясно ниво)	[уретра]
[бедрена кост и става]	[обонятелна луковица]	далак	влагалище
жлъчен мехур (за видове, различни от плъх)	яйчници	[гръдна кост]	срез от костен мозък и/или костномозъчен аспират, прясно фиксиран
Хардцова жлеза			

В случай на чифтен орган, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се консервират и двата органа. Клиничните и другите находки могат да посочат необходимостта от изследвания на допълнителни тъкани. Всякакви други органи, които на основата на познатите свойства на изпитвания химикал се считат за вероятни прицелни органи, също следва да бъдат консервирани. При изследвания, включващи дермален път на прилагане, следва да бъдат консервирани органите, посочени в списъка за прилагане по орален път, като специфично вземане на проби и консервиране на кожа от мястото на прилагане е от съществено значение. При изследвания по инхалаторен път списъкът с тъканите от дихателните пътища за консервиране и изследване следва да е в съответствие с препоръките от глави Б.8. и Б.29. от настоящото приложение. По отношение на други органи/тъкани (и в допълнение към специално консервираните тъкани от дихателните пътища) органите, които следва да бъдат изследвани, са посочени в списъка за прилагане по орален път.

#### Хистопатология

38. Достъпни са насоки относно най-добрите практики при провеждането на изследвания на токсикологичната патология (33). Изследваните тъкани следва да бъдат най-малко:

- всички тъкани от животните от групата с висока доза и от контролната група,
- всички тъкани от животните, които са в терминално състояние или са умъртвени по време на изследването,
- всички тъкани, при които се наблюдават макроскопски аномалии, включително тумори,
- когато свързани с третирането хистопатологични промени се наблюдават в групата с най-висока доза, същите тези тъкани трябва да бъдат изследвани върху всички животни от групите с всички дози, различни от най-високата,
- в случай на чифтни органи, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се изследват и двата органа.

## ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

**Данни**

39. Следва да бъдат посочени индивидуални данни за животните за всички оценени параметри. Допълнително всички данни следва да се обобщят в таблична форма, показваща за всяка изпитвана група броя на животните при започване на изпитването, броя на животните, които са открити мъртви по време на изследването или са били умъртвени по хуманни причини, и времето на смъртта или умъртвяването по хуманни причини, броя на животните с проявени признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето на започването, продължителността и силата на всички токсични въздействия, броя на животните с увреждания, типа на уврежданията и процента на животните, показващи всеки отделен тип увреждане. В таблици с обобщени данни следва да се посочат средните стойности и стандартните отклонения (за непрекъснатите данни от изпитвания) при животни, показващи токсично въздействие или при които са налице увреждания, в допълнение към степенуването на уврежданията.
40. Контролните данни за минали периоди могат да бъдат полезни при интерпретирането на резултатите от изследването, например в случай, когато има признаци, че данните, предоставени от паралелни контроли, показват съществено несъответствие при сравнение с актуални данни от контролни животни от една и съща извършваща изпитвания лаборатория/колония. Ако контролните данни за минали периоди са оценени, следва да се представят от същата лаборатория, да се отнасят за животни на една и съща възраст и от една и съща порода, и да са генерирани през петте години, предхождащи съответното изследване.
41. Където е приложимо, числовите резултати следва да се оценяват чрез използване на подходящ и общоприет статистически метод. Статистическите методи и данните, които следва да се анализират, трябва да се избират по време на планирането на изследването (точка 9). Изборът трябва да предвижда възможност за корекция за преживяемост, ако е необходимо.

**Доклад от изпитването**

42. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

*Изпитван химикал:*

- физическа природа, чистота и физични и химични свойства;
- данни за идентифициране на химикала;
- източник на химикала;
- номер на партидата;
- сертификат за химичен анализ;

*Носител (когато се използва такъв):*

- обосновка за избора на носител (когато носителят е различен от вода);

*Изпитвани животни:*

- използван вид/порода и обосновка за направения избор;
- брой, възраст и пол на животните в началото на изпитването;
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването;

*Условия на изпитването:*

- обосновка за пътя на прилагане и избора на доза;
- когато е приложимо, използваните статистически методи за анализ на данните;
- подробна информация за състава на изпитвания химикал/изготвянето на хранителния режим.
- аналитични данни за достигната концентрация, стабилност и хомогенност на сместа;

- път на прилагане и подробна информация за прилагането на изпитвания химикал;
- за изследвания по инхалаторен път, дали е само през носа, или на цялото тяло;
- действителните дози (mg на kg телесно тегло дневно) и коефициент на превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода (mg на kg или ppm) в действителна доза, ако е приложимо;
- подробности относно качество на храната и водата;

*Резултати (следва да се представят обобщени таблични данни и индивидуални данни за животните):*

#### *Общи положения*

- данни за преживяемостта;
- телесно тегло/промени в телесното тегло;
- консумация на храна, изчисления на усвояването на храната, ако са извършени, и потребление на вода, ако е приложимо;
- токсикокинетични данни (ако са налични);
- офталмоскопия (ако е налична);
- хематология (ако е налична);
- клинична химия (ако е налична);

#### *Клинични находки*

- признаци на токсичност;
- поява (и сила, ако е степенувана) на всякакви аномалии;
- природа, сила и продължителност на наблюдаваните клинични признаци (независимо обратими или необратими);

#### *Данни от аутопсията*

- телесната маса при настъпване на смъртта;
- тегло на органите и техните съотношения, ако е приложимо;
- находки при аутопсията; поява и сила на аномалиите;

#### *Хистопатология*

- хистопатологични находки, които не се отнасят до новообразувания;
- хистопатологични находки, които се отнасят до новообразувания;
- съответствие между находките от макроскопското и микроскопското изследване;
- подробно описание на всички свързани с третирането хистопатологични находки, включително степенуването на силата;

— отчет за всякакви партньорски проверки на предметни стъкла;

*Статистическа обработка на резултатите, където е приложено*

*Обсъждане на резултатите, включващо*

— обсъждане на всякакви подходи за моделиране;

— зависимости доза-отговор;

— контролни данни за минали периоди;

— разглеждане на всякаква информация, свързана с начин на действие;

— определяне на BMD, NOAEL или LOAEL;

— относимост към човека;

*Заключения*

**ПРЕПРАТКИ:**

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.
- (6) Глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“).
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment № 116, available on the OECD public website for Test Guideline at [www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines).
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Глава Б.8 от настоящото приложение („Субакутна инхалаторна токсичност: 28-дневно изследване“).
- (10) Глава Б.29 от настоящото приложение („Субхронична инхалаторна токсичност: 90-дневно изследване“).
- (11) Глава Б.9 от настоящото приложение („Токсичност (дермална) с многократни дози (28 дни)“).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.



- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment № 35 and Series on Pesticides № 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.
- (27) Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication № 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

- 
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Изпитван химикал:** всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

**Б.33. КОМБИНИРАНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ/КАНЦЕРОГЕННОСТ**

## УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 453 на ОИСП (ОИСП TG 453) (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване 453 е прието през 1981 г. Разработването на този преработен метод Б.33 беше сметено за необходимо, за да бъдат отразени последните достижения в областта на хуманното отношение към животните и нормативните изисквания (1) (2) (3) (4) (5). Актуализирането на настоящия метод за изпитване Б.33 е проведено успоредно с преразглеждането на глава Б.32 („Изследвания за канцерогенност“) и глава Б.30 („Изследване за хронична токсичност“) от настоящото приложение, с цел получаване на допълнителна информация от животните, използвани в изследването, и предоставяне на допълнителна подробна информация относно избора на доза. Настоящият метод за изпитване е разработен за използване при изпитвания на широк кръг от химикали, включително пестициди и промишлени химикали. Следва да се отбележи обаче, че някои подробности и изисквания могат да се различават по отношение на лекарствените средства [вж. Насока S1B на Международната конференция по хармонизация (ICH) относно изпитване за канцерогенност на фармацевтични продукти].
2. По-голямата част от изследванията за хронична токсичност и канцерогенност се извършват върху различни видове гризачи и следователно настоящият метод за изпитване е предназначен да се прилага основно за изследвания, провеждани върху тези видове. Ако за такива изследвания се изисква използване на видове, различни от гризачи, описаните принципи и процедури, заедно с тези, описани в глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“) (6), могат също така да се прилагат, с подходящи изменения, така както са описани в Ръководство на ОИСП № 116 за планиране и провеждане на изследвания за хронична токсичност и за канцерогенност (7).
3. Трите основни пътя на прилагане, използвани при изследвания за хронична токсичност/канцерогенност, са орален, дермален и инхалационен. Изборът на път на прилагане зависи от физичните и химичните характеристики на изпитвания химикал и от преобладаващия път на експозиция при хора. Допълнителна информация за избора на път на експозиция е представена в Ръководство № 116 (7).
4. Настоящият метод за изпитване е съсредоточен върху експозицията по орален път — най-често използваният път в изследванията за хронична токсичност и канцерогенност. Макар че дългосрочни изследвания, включващи експозиция по дермален или инхалационен път, могат също да бъдат необходими за оценка на риска за човешкото здраве и/или могат да бъдат изисквани по силата на някои нормативни уредби, посочените два пътя на експозиция са със значителна техническа сложност. Такива изследвания трябва да се планират за всеки конкретен случай, въпреки че описаният тук метод за изпитване за оценка на хронична токсичност и канцерогенност чрез прилагане по орален път би могъл да послужи за основа на протокол за изследвания, включващи инхалационен и/или дермален път, по отношение на препоръките за периодите за третиране, клиничните параметри и параметрите на патологията, и други. Налични са насоки на ОИСП за прилагане на изпитвани химикали по инхалационен (7) (8) и дермален път (7). Глава Б.8 от настоящото приложение (9) и глава Б.29 от настоящото приложение (10), заедно с Ръководство на ОИСП за изпитване за остра инхалаторна токсичност (8), следва специално да бъдат консултирани при планирането на по-дългосрочни проучвания, включващи експозиция по инхалационен път. Глава В.9 от настоящото приложение (11) следва да бъде консултирана в случай на изпитване, провеждано по дермален път.
5. Комбинираното изследване за хронична токсичност/канцерогенност предоставя информация за възможните рискове за здравето, произтичащи по всяка вероятност от повтаряща се експозиция за период, стигащ до продължителността на живота на вида, който се използва при изследването. Изследването предоставя информация за токсичните ефекти на изпитвания химикал, включително потенциална канцерогенност, посочва прицелните органи и възможността за акумулиране. То може да предостави оценка на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект за токсични ефекти и — в случаите с канцерогени, различни от генотоксичните — за туморни отговори, което може да бъде използвано за установяване на критерии за безопасност при експозиция на хора. Набляга се и върху нуждата от обстойни клинични наблюдения, правени над животни с цел да се получи колкото е възможно повече информация.
6. Целите на изследванията за хронична токсичност/канцерогенност, обхванати от настоящия метод за изпитване, включват:
  - идентифициране на канцерогенните свойства на даден изпитван химикал, водещи до по-честа поява на тумори, по-голям пропорционален дял на злокачествените тумори, или до намаляване на времето за поява на тумори в сравнение с паралелни контролни групи,
  - идентифициране на времето за поява на тумори,
  - идентифициране на хроничната токсичност на изпитвания химикал,

- идентифициране на прицелния(те) орган(и) за хроничната токсичност и канцерогенността,
- характеризиране на зависимостта доза-отговор,
- идентифициране на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) или на отправната точка за установяване на еталонна доза (BMD),
- екстраполация на канцерогенните ефекти за експозиция на човека при ниски нива на доза,
- прогнозиране на ефекти на хронична токсичност при нива на експозиция на човека,
- предоставяне на данни на изпитване на хипотези относно начина на действие (2) (7) (12) (13) (14) (15).

#### ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

7. При оценката на потенциалната канцерогенност и хронична токсичност на даден изпитван химикал цялата достъпна информация за изпитвания химикал следва да бъде разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждането на изследването, с цел да се съсредоточи планът на изследването върху по-ефикасно изпитване на неговите токсикологични свойства и да се сведе до минимум използването на животни. Информацията за и разглеждането на начина на действие на предполагаемия канцероген (2) (7) (12) (13) (14) (15) е от особено значение, тъй като оптималният план може да се различава в зависимост от това дали изпитваният химикал е известен или предполагаем генотоксичен канцероген. Допълнителни насоки относно разглеждането на начина на действие могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7).
8. Информация, която ще помогне за съставянето на план на изследването, включва идентичност, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; всякаква информация за начина на действие; резултатите от всякакви извършени *in vitro* или *in vivo* изпитвания за токсичност, включително изпитвания за генотоксичност; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност, мутагенност/генотоксичност, канцерогенност и други токсикологични данни за химикали със сходна структура; достъпни токсикокинетични данни (данни за кинетика на еднократна, а също и на повтаряща се доза, където са достъпни) и данни, получени от други изследвания с повтаряща се експозиция. Определянето на хроничната токсичност/канцерогенността трябва да се извършва само след получаване на първоначална информация относно токсичността от 28-дневно и/или 90-дневно изпитвания за токсичност при повтаряща се доза. Краткосрочни изпитвания за зараждане и размножение на ракови клетки също така биха могли да предоставят полезна информация. Поетапният подход за изпитване за канцерогенност следва да се разглежда като част от цялостната оценка на възможните неблагоприятни въздействия на даден изпитван химикал върху здравето (16) (17) (18) (19).
9. Статистическите методи, които са най-подходящи за анализ на резултатите, като се имат предвид планът на изследването и целите, следва да бъдат определени преди началото на изследването. Въпроси за разглеждане включват дали статистиката следва да включва корекция за преживяемост, анализ на кумулативни рискове от тумори, свързани с продължителността на преживяемостта, анализ на времето до образуване на тумора и анализ в случай на преждевременно прекратяване на използването на една или повече групи. Насоки относно подходящите статистически анализи и ключови препратки към международно приети статистически методи са дадени в Ръководство № 116 (7), също и в Ръководство № 35 за анализ и оценка на изследвания за хронична токсичност и канцерогенност (20).
10. При провеждане на изследването за канцерогенност ръководните принципи и съображенията, формулирани в Ръководството на ОИСП относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността (21), и по-специално точка 62 от него, следва винаги да бъдат спазвани. В тази точка е посочено, че „при изследвания, включващи прилагане на повтарящи се дози, когато дадено животно показва клинични признаци, които са прогресивни, водещи до по-нататъшно влошаване на състоянието, следва да се вземе информирано решение дали да се разреши или не животното да бъде умъртвено по хуманен начин. Решението следва да включва съображение относно стойността на информацията, която ще бъде получена от продължаване на изследването с даденото животно във връзка с общото му състояние. Ако се вземе решение за продължаване на изпитването с животното, честотата на наблюденията трябва да се увеличи доколкото е необходимо. Би било възможно също така, без да се засяга неблагоприятно целта на изпитването, временно да бъде преустановено дозирането, ако това ще допринесе за премахване на болката или дистреса, или да бъде намалена дозата на изпитването.“
11. Подробни насоки относно и обсъждане на принципите на избора на доза за изследванията за хронична токсичност и канцерогенност могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7), както и в две публикации на Международния институт за науките за живота (22) (23). Основната стратегия за избор на доза зависи от основната цел или цели на изследването (точка 6). При избора на подходящи нива на доза следва да се постигне равновесие между скрининга за опасност, от една страна, и характеризирането на отговорите на ниски дози и тяхната уместност, от друга страна. Това е от особено значение в случая на настоящото комбинирано изследване за хронична токсичност и за канцерогенност.

12. Следва да се разгледа възможността за провеждане на настоящото комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност, вместо отделно провеждане на изследване за хронична токсичност (глава Б.30 от настоящото приложение) и на изследване за канцерогенност (глава Б.32 от настоящото приложение). Комбинираното изпитване осигурява по-голяма ефикасност по отношение на време и разходи и известно намаляване на използването на животни в сравнение с провеждането на две отделни изследвания, без да се прави компромис с качеството на данните нито във фазата на изпитване за хронична токсичност, нито във фазата за канцерогенност. Следва обаче да се обърне внимание на принципите на избора на доза (точка 11 и 22—26), когато се предприема комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност, и също така се признава, че по някои нормативни уредби може да се изискват отделни изследвания. Допълнителни насоки за планирането на комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност, за да се постигне максимална ефикасност на изследването както по отношение на възможностите за намаляване на броя на използваните животни, така и чрез рационализиране на различните опитни процедури, могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7).
13. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в края на тази глава и в Ръководство № 116 (7).

#### ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

14. Планът на изследването се състои от две успоредни фази — фаза за хронична токсичност и фаза за канцерогенност (за продължителността им вж. съответно точка 34 и 35). Изпитваният химикал обикновено се прилага по орален път, въпреки че изпитването по инхалаторен или дермален път може също да е подходящо. Във фазата за хронична токсичност изпитваният химикал се прилага ежедневно, в постепенно нарастващи дози, на няколко групи изпитвани животни, по едно ниво на доза за група, обикновено за срок от 12 месеца, въпреки че по-дълги или по-кратки продължителности също могат да бъдат избрани в зависимост от нормативните изисквания (вж. точка 34). Тази продължителност е избрана да бъде достатъчно дълга, за да позволи проявяване на всякакви ефекти от кумулативна токсичност без водещите до невъзможност за разграничаване ефекти, внасяни от старчески изменения. Планът на изследването може също да включва едно или повече междинни умъртвявания, например на 3 и 6 месеца, като могат да бъдат включени допълнителни групи животни за да се съобрази това (вж. точка 20). Във фазата за канцерогенност изпитваният химикал се прилага ежедневно на няколко групи изпитвани животни за по-голямата част от живота им. Животните в двете фази се наблюдават отблизо за признаци на токсичност и за развитието на отнасящи се до новообразувания увреждания. Животните, които умират или са умъртвени по време на изпитването, се аутопсират, а преживелите животни се умъртвяват и се аутопсират при приключването на изпитването.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Избор на животински вид

15. Настоящият метод за изпитване основно обхваща оценка на хроничната токсичност и канцерогенността при гризачи (точка 2). Използването на видове, различни от гризачи, може да бъде разглеждано, когато наличните данни показват, че те са по-подходящи за прогнозиране на последиците за здравето на човека. Изборът на вида следва да се обоснове. Предпочитаният вид гризач е плъхът, въпреки че могат да се използват и други видове от гризачи, например мишки. Въпреки че използването на мишки в провеждането на изпитвания за канцерогенност може да има ограничена ползност (24) (25) (26), при някои настоящи регулаторни програми все още се изисква изпитване за канцерогенност при мишки, освен ако се установи, че подобно проучване не е необходимо от научна гледна точка. Плъховете и мишките са предпочитани опитни модели поради тяхната относително кратка продължителност на живота, широкото им използване при фармакологични и токсикологични изследвания, тяхната склонност към образуване на тумори, както и наличието на достатъчно характеризирани породи. В резултат на тези характеристики е налично голямо количество информация относно тяхната физиология и патология. Планирането и провеждането, при необходимост, на изследвания за хронична токсичност/канцерогенност върху видове, различни от гризачи, следва да се основава на принципите, описани в настоящия метод за изпитване заедно с тези от глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“) (6). Допълнителна информация за избора на вид и порода е представена в Ръководство № 116 (7).
16. Следва да се използват здрави млади полово зрели животни от обичайно използваните за лабораторни изследвания породи. Комбинираното изследване за хронична токсичност/канцерогенност трябва да се провежда върху животни от една и съща порода и източник като тези, които са използвани при предварителното(ите) изследване(ия) за токсичност с по-малка продължителност, но ако за животни от тази порода и източник е известно, че могат да причинят проблеми при постигането на обичайно признатите критерии за преживяемост при дългосрочни изследвания [вж. Ръководство № 116 (7)], следва да се разгледа възможността за използването на порода на животно, която има приемлив процент на преживяемост за дългосрочното изследване. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни.

##### Условия на отглеждане и хранене

17. Животните могат да бъдат настанени в клетките индивидуално или на малки групи от един и същ пол; индивидуалното настаняване следва да се разглежда само ако е научно обосновано (27) (28) (29). Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C (± 3 °C). Въпреки че относителната влажност трябва да е най-малко 30 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението, целта следва да е 50—60 %. Осветлението следва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Хранителният режим следва да отговаря на всички изисквания към храната за съответния изпитван вид, а съдържанието в храната на замърсители, включващи, но без да се ограничават до остатъци от пестициди, устойчиви органични замърсители, фитоестрогени, тежки метали и микотоксини, които биха могли да окажат въздействие върху резултата от изпитването, трябва да е възможно най-ниско. Следва периодично да се генерира аналитична информация

относно равнищата на хранителните вещества и замърсителите в хранителния режим, най-малко в началото на изследването и когато има промяна в използваната партида, и същата следва да бъде включена в окончателния доклад. По подобен начин следва да бъде предоставена аналитична информация за питейната вода, използвана в изследването. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от необходимостта да се осигури подходящо смесване с изпитвания химикал и да бъдат изпълнени изискванията за хранене на животните, когато изпитваният химикал се прилага чрез хранителния режим.

#### **Подготовка на животните**

18. Следва да се използват здрави животни, които предварително са се аклиматизирали към лабораторните условия в продължение най-малко на 7 дни и върху които не са извършвани предходни опитни процедури. При гризачите дозирането на животните следва да започне колкото е възможно по-скоро след отбиването и аклиматизацията и, за предпочитане, преди животните да навършат 8 седмици. Опитните животни трябва да се опишат по отношение на вид, порода, източник за доставка, пол, телесно тегло и възраст. При започване на изследването колебанието на индивидуалните стойности на телесното тегло на използваните животни трябва да бъде минимално и да не превишава  $\pm 20\%$  от средното тегло на всички животни от същия пол в рамките на изследването. Животните се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за третиране. След прилагането на подбора на случаен принцип следва да няма значителни разлики между средните стойности на телесното тегло в отделните групи в рамките на съответния пол. Ако съществуват статистически значими разлики, тогава стъпката по подбор на случаен принцип трябва да се повтори, ако е възможно. За всяко животно се определя уникален идентификационен номер и му се поставя постоянна маркировка с този номер чрез поставяне на татуировка, имплантиране на микрочип или чрез друг подходящ метод.

#### **ПРОЦЕДУРА**

##### **Брой и пол на животните**

19. Следва да се използват и двата пола. Трябва да се използва брой животни, който е достатъчен да направи възможно извършването на задълбочена биологична и статистическа оценка. За гризачи всяка група с определена доза (както е посочено в точка 22) и паралелна контролна група, планирани за използване във фазата за канцерогенност от изследването, трябва следователно да се състои от най-малко 50 животни от всеки пол. В зависимост от целта на изследването може да бъде възможно увеличаване на статистическата мощност на ключовите оценки чрез диференцирано неравномерно разпределяне на животни по групите с различни дози, с повече от 50 животни в групите с ниски дози, например, за определяне на канцерогенен потенциал при ниски дози. Следва да се признае обаче, че умерено увеличение на размера на групата ще доведе до относително слабо нарастване на статистическата мощност на изследването. За гризачи всяка група с определена доза (както е посочено в точка 22) и паралелна контролна група, планирани за използване във фазата за хронична токсичност от изследването, трябва да се състои от най-малко 10 животни от всеки пол. Следва да се отбележи, че този брой е по-малък от броя в изследването за хронична токсичност (глава Б.30 от настоящото приложение). Интерпретирането на данните от намаления брой животни в група във фазата за хронична токсичност на това комбинирано изследване обаче ще бъде подпомогнато с данните от по-големия брой животни във фазата за канцерогенност от изследването. При изследвания, включващи мишки, могат да бъдат необходими допълнителни животни във всяка група с определена доза във фазата за хронична токсичност, за извършване на всички изисквани хематологични определения. Допълнителна информация относно статистическия план на изследването и избора на нива на доза за максимизиране на статистическата мощност се дава в Ръководство № 116 (7).

##### **Планиране на междинни умъртвявания, сателитни групи и животни от индикаторна група**

20. Изследването може да предвижда междинни умъртвявания, например на 6 месеца във фазата за хронична токсичност, за предоставяне на информация за напредването на изменения, които не се отнасят се до новообразувания, и механистична информация, ако е научно обосновано. Когато такава информация вече е достъпна от предходни изследвания на изпитвания химикал за токсичност при повтарящи се дози, възможно е междинните умъртвявания да не са научно обосновани. Животните, използвани във фазата за хронична токсичност от изследването, обикновено с продължителност от 12 месеца (точка 34), предоставят данни от междинно умъртвяване за фазата за канцерогенност от изследването, като по този начин се постига намаляване на броя на животните, използвани като цяло. Във фазата за хронична токсичност от изследването могат да бъдат включени също и сателитни групи, за мониторинг на обратимостта на всякакви токсикологични промени, причинени от изпитвания химикал, който е предмет на проучването. Те могат да бъдат ограничени до най-високото ниво на доза за изследването, плюс контрол. Допълнителна индикаторна група от животни (обикновено по 5 животни от всеки от двата пола) може да бъде включена, за мониторинг на здравния статус по време на изследването, ако е необходимо (30). Допълнителни насоки относно планирането на изследването за включване на междинни умъртвявания, животни в сателитни и индикаторни групи, като в същото време се сведе до минимум броят на животни, използвани като цяло, са дадени в Ръководство № 116 (7).
21. Ако в плана на изследването са включени сателитни групи и/или междинни умъртвявания, броят на животните във всяка група с определена доза, определени за тази цел, обикновено е 10 животни от пол, и общият брой животни, включени в плана на изследването, трябва да бъде увеличен с броя животни, които са планирани за междинно умъртвяване преди приключването на изследването. Животните за междинни умъртвявания и от сателитни групи по принцип трябва да преминават през същите наблюдения, както животните във фаза хронична токсичност на основното изследване, включително телесно тегло, консумация на храна/вода, хематологични и клинични биохимични измервания и проучване на патологията, въпреки че също така може да се постанови (в групите за междинно умъртвяване) измерванията да се ограничат до специфични ключови измервания като невротоксичност или имунотоксичност.

##### **Групи с определени дози и дозиране**

22. Насоки по всички аспекти на избора на доза и интервалите между нивата на доза са предоставени в Ръководство № 116 (7). Следва да се използват най-малко три нива на доза и паралелен контрол и за двете фази — за хронична токсичност и за канцерогенност. Нивата на доза обикновено са основани на резултатите от по-краткосрочни изследвания при повтаряща се доза, или на изследвания за определяне на обхвата, и следва да са съобразени с всякакви достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него химикали.

23. За фазата за хронична токсичност от изследването цялостно изследване с използване на три нива на доза може да не се счита за необходимо, ако може да се очаква, че в изпитване с едно ниво на доза, равностойно на най-малко 1 000 mg на kg телесно тегло дневно, е малко вероятно да предизвика вредни ефекти. Това следва да се основава на информация от предварителни изследвания и на заключение, че не може да се очаква токсичност въз основа на данни от структурно свързани химикали. Като горна граница може да се приложи 1 000 mg на kg телесно тегло на ден, с изключение на случаите, при които експозиция на хора подсказва нуждата от използване на по-високо ниво на доза.
24. Освен ако не е ограничено от физичното или химичното естество, или от биологичните ефекти на изпитвания химикал, най-високото ниво на доза следва да се избере така, че да се установят основните прицелни органи и токсични ефекти, като същевременно се избягва страдание, силна токсичност, заболяемост или смърт. Най-високото ниво на доза трябва по принцип да бъде избирано така, че да бъдат получени доказателства за токсичност, както се доказва, например, чрез подтискане наддаването на тегло (около 10 %). Въпреки това, в зависимост от целите на изследването (вж. точка 6), може да бъде избрана максимална доза, която да е по-ниска от дозата, доказваща наличието на токсичност, например, ако при дадена доза се проявява неблагоприятен ефект, който дава повод за загриженост, но който има незначително влияние върху продължителността на живота или телесното тегло.
25. Нивата на доза и интервалите между тях могат да бъдат избрани така, че да бъдат установени зависимостта доза-отговор и — в зависимост от начина на действие на изпитвания химикал — NOAEL или други очаквани резултати от изследването, например BMD (вж. точка 27). Фактори, които следва да бъдат разглеждани при поставянето на по-ниски дози, включват очаквания наклон на кривата доза-отговор, дозите, при които могат да настъпят важни промени в метаболизма или в начина на токсично действие, когато се очаква праг, или когато се очаква отправна точка за екстраполиране на ниски дози. При провеждането на комбинирано изпитване за хронична токсичност/канцерогенност основната цел е да се получи информация за оценката на риска от канцерогенност, като информацията за хроничната токсичност обичайно е спомагателна цел. Това следва да се има предвид при определянето на нивата на доза и интервалите между тях за изследването.
26. Избраните интервали между нивата на доза зависят от целите на изследването и от характеристиките на изпитвания химикал и не могат да бъдат подробно предписани в настоящия метод за изпитване, но от двукратни до четирикратни интервали често дават добри параметри на изпитването, когато се използват за определяне на намаляващите нива на доза, и добавянето на четвърта група за изпитване често се предпочита пред използване на големи интервали (например с кратност, надвишаваща 6—10 пъти) между дозирането. По принцип използване на кратност над 10 следва да се избягва и, ако се използва, следва да бъде обосновано.
27. Както е допълнително разглеждано в Ръководство № 116 (7), точки, които трябва да бъдат взети предвид при избора на доза, включват:
- познати или предполагаеми нелинейни зависимости или инфлексни точки в зависимостта доза-отговор,
  - токсикокинетика и обхвати на дозиране, при които се получава, или не се получава, метаболитна индукция, наситяване или нелинейна зависимост между външни и вътрешни дози,
  - увреждания-прекурсори, маркери на ефект или показатели за протичане в дълбочина на ключови биологични процеси,
  - ключови (или предполагаеми) аспекти на начина на действие, като например дози, при които започва да се проявява цитотоксичност, появяват се нарушения в хормоналните равнища и механизмите на хомеостазата, и др.,
  - области от кривата доза-отговор, в които е необходима особено устойчива оценка, напр. в обхвата на очакваната BMD или предполагаем праг,
  - съобразяване на предполагаеми нива на експозиция на човека, особено при избора на средни и ниски дози.
28. Контролната група не се третира или е контролна група за носителя в случаите, когато за въвеждането на изпитвания химикал се използва носител. С изключение на самата обработка с изпитвания химикал, животните в контролната група следва да се третират по същия начин като тези от групите за изпитване. Когато се използва носител, животните от контролната група се третират с най-големия обем носител измежду обемите, при които се третират групите на дози. Ако изпитваният химикал се прилага чрез хранителен режим и причинява значително намаляване на приема на храна поради понижени вкусови качества на хранителния режим, може да бъде полезна допълнителна контролна група, получаваща същото количество храна, която да служи като по-подходяща контрола.

#### **Приготвяне на дозите и прилагане на изпитвания химикал**

29. Изпитваният химикал обичайно се прилага през устата, чрез хранителния режим или питейната вода, или чрез хранене през сонда. Допълнителна информация за пътища и начини на прилагане е представена в Ръководство № 116 (7). Пътят и начинът на прилагане зависят от целта на изследването, физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, неговата биодостъпност и преобладаващия път и начин на експозиция на хора. Следва да се представи обосновка за избрания път и начин на прилагане. С оглед на хуманното отношение към животните, храненето по орален път през сонда по принцип следва да се избира само за онези агенти, за които този път и начин на

прилагане е в разумна степен представителен за потенциалната експозиция на хора (напр. фармацевтични продукти). За химикали, свързани с хранителния режим или с околната среда, включително пестициди, прилагането е обичайно чрез хранителния режим или чрез питейната вода. Въпреки това, при някои сценарии, напр. професионална експозиция, прилагане по други пътища може да бъде по-подходящо.

30. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Трябва да бъдат разгледани следните характеристики на носителя и, съответно, други добавки: ефекти върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържането на изпитвания химикал; ефекти върху химичните свойства на изпитвания химикал, които могат да изменят токсикологичните му характеристики; и ефектите върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това — разтвор/емулсия в масло (напр. царевично олио), а след това — разтваряне в други носители. Когато се използват други носители освен водата, трябва да се познаят токсикологичните свойства на носителя. Следва да е достъпна информацията относно стабилността на изпитвания химикал и хомогенността на разтворите за дозиране или на храната (в зависимост от случая) при условията на прилагане (напр. чрез хранителен режим).
31. За химикали, които се прилагат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството изпитван химикал не въздейства върху нормалното хранене и водния баланс. При дългосрочни изследвания за токсичност с прилагане чрез хранителния режим концентрацията на изпитвания химикал в храната по принцип не трябва да надвишава горна граница от 5 % от общото количество храна, с цел да се избегне небалансирано хранене. Когато изпитваният химикал се прилага с храната, може да се използва или постоянна концентрация в храната (mg/kg храна или ppm), или постоянно ниво на доза от гледна точка на телесното тегло на животното (mg на kg телесно тегло), изчислявани на седмична основа. Използваната алтернатива трябва да бъде посочена.
32. В случай на прилагане по орален път дозата изпитван химикал се дава на животните ежедневно (седем дни в седмицата) за период от 12 месеца (фаза за хронична токсичност) или 24 месеца (фаза за канцерогенност) (вж. също точка 33 и 34). Необходимо е да се обосноват причините за използването на всякакъв друг режим на дозиране, например пет дни в седмицата. В случай на прилагане по дермален път животните обичайно са третираны с изпитвания химикал в продължение на най-малко 6 часа в денонощието, 7 дни в седмицата, както е определено в глава Б.9 от настоящото приложение (11), за период от 12 месеца (фаза за хронична токсичност) или 24 месеца (фаза за канцерогенност). Експозицията по инхалаторен път се извършва в продължение на 6 часа в денонощието, 7 дни в седмицата, но експозиция за 5 дни седмично също може да бъде прилагана, ако е обоснована. Продължителността на експозицията по принцип е 12 месеца (фаза за хронична токсичност) или 24 месеца (фаза за канцерогенност). Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Трябва да бъде предоставена обосновка при използване на продължителност на експозицията по-малка от 6 часа дневно. Вж. също глава Б.8 от настоящото приложение (9).
33. Когато изпитваният химикал се прилага чрез сонда на животните, това следва да се извърши посредством стомашна тръбичка или подходяща канюла за интубация, по едно и също време всеки ден. Обикновено еднократната доза се прилага веднъж дневно, но когато например даден химикал е местен дразнител, може да е възможно поддържането на ежедневната доза да се извършва чрез прилагането ѝ като разделена доза (два пъти дневно). Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Обемът следва да се запазва възможно най-нисък и по принцип не следва да надхвърля 1 ml/100 g телесно тегло за гризачи (31). Варирането на обема за изпитването следва да бъде сведено до минимум чрез настройване на концентрацията така, че да се осигури постоянен обем при всички нива на доза. Потенциално корозивните или дразнещи химикали са изключение и трябва да бъдат разредени, за да се избегнат силни локални ефекти. Изпитването при концентрации, за които съществува вероятност да причиняват корозивно или дразнещо действие върху стомашно-чревния тракт, следва да се избягва.

#### Продължителност на изследването

34. Периодът на дозирането и продължителността на фазата за хронична токсичност при това изследване обичайно е 12 месеца, като планът на изследването допуска също така, и може да бъде прилаган или за изследвания с по-малка продължителност (напр. 6 или 9 месеца), или за такива с по-голяма (напр. 18 или 24 месеца), в зависимост от изискванията на специфичната нормативна уредба или за конкретни механистични цели. Отклоненията от продължителността на експозиция от 12 месеца трябва да бъдат обосновани, особено в случаите с по-кратка продължителност. Животните от всички групи с определена доза, разпределени към тази фаза, се умъртвяват в определеното време за оценка на хроничната токсичност и патологията, която не се отнася до новообразувания. Сателитните групи, включени за мониторинг на обратимостта на всякакви токсикологични промени, индуцирани от изпитвания химикал, предмет на проучването, следва да бъдат оставени без дозиране за период не по-кратък от 4 седмици и не по-дълъг от една трета от общата продължителност на изследването след приключването на експозицията.
35. Продължителността на фазата за канцерогенност от това изследване обичайно е 24 месеца за гризачи, представляващи по-голямата част от нормалната продължителност на живота на животните, които ще бъдат използвани. По-дълги или по-кратки продължителности на изследване могат да бъдат използвани, в зависимост от продължителността на живота на породата от изследвания животински вид, но следва да бъдат обосновани. За конкретни породи мишки, напр. AKR/J, C3H/J или C57BL/6J, продължителност от 18 месеца може да е



по-подходяща. Следното също така предоставя някои насоки относно продължителността, прекратяването на изследването и преживяемостта; допълнителни насоки, включително разглеждане на приемливостта на отрицателен резултат от изпитване за канцерогенност, свързан с преживяемостта в изследването, са предоставени в Ръководство № 116 (7):

- Следва да се разгледа възможност за прекратяване на изследването, когато броят на преживелите животни в групите на по-ниски дози или в контролната група спадне под 25 процента.
- В случая, когато само животните от групата с висока доза умират преждевременно поради токсичност, това не следва да води до прекратяване на изследването.
- Преживяването на всеки от двата пола трябва да се разглежда отделно.
- Изследването не следва да бъде продължавано отвъд точката, в която достъпните данни от изследването вече не са достатъчни за даване на възможност за извършване на статистически обоснована оценка.

#### НАБЛЮДЕНИЯ (ФАЗА ЗА ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ)

36. Всички животни трябва да бъдат проверени за заболяемост или смъртност, обикновено в началото и в края на всеки ден, включително в съботни и неделни дни и празници. Поне един път на ден се правят общи клинични наблюдения, за предпочитане по едно и също време, като се взема предвид периодът с пикови стойности на очакваните въздействия след получаване на дозата в случаите на прилагане чрез хранене през сонда.
37. Следва да се провеждат подробни клинични наблюдения на всички животни най-малко веднъж преди първата експозиция (за да се даде възможност за интрасубектни сравнения), в края на първата седмица на изследването и месечно след това. Протоколът от наблюденията трябва да бъде изготвен така, че колебанията на стойностите между извършващите наблюденията да са сведени до минимум и да са независими от изпитваната група. Тези наблюдения следва да се правят извън клетката, която обитава животното, за предпочитане в стандартна обстановка и във всички случаи по едно и също време. Тези наблюдения следва да се описват внимателно, за предпочитане с използване на точкови системи, изрично определени от лабораторията, извършваща изпитвания. Трябва да бъде направено усилие да се осигурят минимални колебания в условията за наблюдение. Отбелязваните симптоми следва да включват, без да се ограничат само до промяна в кожата, козината, очите, лигавиците, поява на секречия и екскречия, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане). Следва да се записват също и изменения в походката, стойката и реакцията при боравене, както и наличието на клонични или тонични движения, стереотипно (например прекомерно подтържане на външния вид, повтарящо се обикаляне в кръг) или необичайно поведение (например самоосакатяване, вървене назад) (32).
38. Преди първото прилагане на изпитвания химикал на всички животни следва да бъдат извършени офталмологични изследвания с използване на офталмоскоп или друго подходящо устройство. За предпочитане е, при прекратяване на изследването, това изследване да се проведе върху всички животни, но най-малко върху групите, експонирани на високата доза, и върху контролните групи. Ако се открият свързани с третирането изменения в очите, всички животни трябва да бъдат изследвани. Ако от структурен анализ или от друга информация се предполага токсичност за очите, тогава честотата на изследванията на очите следва да бъде увеличена.
39. За химикали, за които в предходни 28-дневни и/или 90-дневни изпитвания за токсичност с повтаряща се доза има показания за потенциал за предизвикване на невротоксични ефекти, като опция сензорната реактивност към различни видове стимули (32) (напр. слухови, зрителни и проприоцептивни) (33) (34) (35), оценката на силата на захвата (36) и на двигателната активност (37) могат да бъдат извършени преди започването на изследването и на 3-месечни периоди след началото на изследването, включително до изтичане на 12 месеца, както и при прекратяване на изследването (ако продължителността му е над 12 месеца). Допълнителни уточнения по процедурите, които могат да бъдат следвани, са дадени в съответните препратки. Въпреки всичко могат да се използват и алтернативни процедури, различни от тези, към които се препраща.
40. За химикали, за които в предходни 28-дневни и/или 90-дневни изпитвания за токсичност с повтаряща се доза има показания за потенциал за предизвикване на имунотоксични ефекти, като опция по-нататъшни проучвания на тази крайна точка могат да бъдат извършени при прекратяването.

#### *Телесно тегло, консумация на храна/вода и усвояване на храната*

41. Всички животни трябва да бъдат претегляни в началото на третирането, след това най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Измерването на консумацията на храна и на усвояването на храната следва да се извършва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Консумацията на вода трябва да се измерва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно, ако химикалът се прилага чрез питейната вода. Измервания на консумацията на вода също следва да бъдат предвидени при изследвания, при които питейната активност се изменя.

*Хематология и клинична биохимия*

42. При изследвания, включващи гризачи, трябва да се извършват хематологични изследвания върху всички животни от изследването (10 мъжки и 10 женски животни на група) на 3, 6 и 12 месеца, както и при прекратяване на изследването (ако е по-дълго от 12 месеца). При мишките може да са необходими сателитни животни за осъществяването на всички изисквани хематологични определения (вж. точка 19). При изследвания с използване на животни, различни от гризачи, се вземат проби от по-малък брой животни (например 4 животни от пол за група при изследвания с използване на кучета), на междинни времена на пробовземане и при прекратяване на изпитването, както е описано за гризачите. Измервания на 3 месеца, както при гризачи, така и при животни, различни от гризачи, не е необходимо да се провеждат, ако в предходно 90-дневно изследване, проведено при сравними нива на доза, не е наблюдавано въздействие върху хематологичните параметри. Кръвните проби се вземат от избран обект, например чрез сърдечна пункция, или от ретроорбиталния синус, под упойка.
43. Параметрите от следния списък следва да бъдат изследвани (38): общ и диференциален брой левкоцити, брой на еритроцитите, брой на тромбоцитите, концентрация на хемоглобин, хематокрит, среден обем на еритроцитите (MCV), средно съдържание на хемоглобин (MCH), средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите (MCHC), протромбиново време и активирано парциално тромбoplastиново време. Други хематологични параметри, като телца на Heinz или друга нетипична морфология на еритроцити или метхемоглобин, могат да бъдат измервани според случая в зависимост от токсичността на изпитвания химикал. Като цяло следва да се възприеме гъвкав подход, в зависимост от наблюдаваното и/или очакваното въздействие от даден изпитван химикал. Ако изпитваният химикал оказва влияние върху кръвотворната система, изследвания на броя на ретикулоцитите и цитологията на костния мозък може също така да бъдат необходими, макар че не е нужно същите да се провеждат рутинно.
44. Клиничните биохимични определения за проучване на главните токсични ефекти върху тъканите, и по-специално върху бъбреците и черния дроб, следва да се извършват върху кръвни проби, получени от всички изследвани животни (10 мъжки и 10 женски животни от група) в интервали от време, идентични с интервалите при хематологичните изследвания. При мишките може да са необходими сателитни животни за осъществяването на всички изисквани клинични биохимични определения. При изследвания с използване на животни, различни от гризачи, се вземат проби от по-малък брой животни (например 4 животни от пол за група при изследвания с използване на кучета), на междинни времена на пробовземане и при прекратяване на изпитването, както е описано за гризачите. Измервания на 3 месеца, както при гризачи, така и при животни, различни от гризачи, не е необходимо да се провеждат, ако в предходно 90-дневно изследване, проведено при сравними нива на доза не е наблюдавано въздействие върху клиничните биохимични параметри. Препоръчва се гладуване през нощта за животните (с изключение на мишки) преди вземането на кръвните проби<sup>(1)</sup>. Параметрите от следния списък следва да бъдат изследвани (38): глюкоза, уреа (азот в уреа), креатинин, общо белтъци, албумин, калций, натрий, калий, общо холестерол, най-малко две подходящи изпитвания за хепатоцелуларна оценка (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, глутаматдехидрогеназа, общо жлъчни киселини) (39) и най-малко две подходящи изпитвания за хепатобилиарна оценка (алкална фосфатаза, гама-глутамилтрансфераза, 5'-нуклеотидаза, общо билирубин, общо жлъчни киселини) (39). Други клинични химични параметри, като триглицериди на гладно, специфични хормони и холинестераза, могат да бъдат измервани според случая в зависимост от токсичността на изпитвания химикал. Като цяло е необходим гъвкав подход, в зависимост от наблюдаваното и/или очакваното въздействие от даден изпитван химикал.
45. Изследвания на урината следва да се извършат върху всички изследвани животни (10 мъжки и 10 женски животни от група), чрез проби, събрани през същите интервали, както за хематологичните и клиничните химични изследвания. Измервания на 3 месеца не е необходимо да се провеждат, ако в предходно 90-дневно изследване, проведено при сравними нива на доза, не е наблюдавано въздействие върху изследванията на урина. Следният списък с параметри е бил включен в експертна препоръка относно изследванията на клиничната патология (38): външен вид, обем, осмолалност или относителна плътност, рН, общо белтъци и глюкоза. Други определения включват кетон, уробилиноген, билирубин и скрити кръвоизливи. Когато е необходимо, с оглед разширяване на проучването върху наблюдаваните въздействия, могат да се използват и допълнителни параметри.
46. Като цяло се счита, че е необходимо базовите хематологични или клинични биохимични променливи да бъдат определени преди третиране при изследвания с кучета, но не е необходимо да се определят при изследвания с гризачи (38). Ако обаче базовите данни от минали периоди (вж. точка 58) са неподходящи, следва да се обмисли генериране на такива данни.

## ПАТОЛОГИЯ

*Макроскопска аутопсия*

47. Всички животни, подложени на изследване, обичайно следва да са обект на цялостна, подробна макроскопска аутопсия, която включва внимателен преглед на външната повърхност на тялото, всички отвори и черепната, гръбната и коремната кухини и тяхното съдържание. Въпреки това също така може да бъде предвидено (при междинните умъртвявания или сателитните групи) измерванията да се ограничат до специални ключови мерки, като невротоксичност или имунотоксичност (вж. точка 21). Тези животни не следва да се подлагат на аутопсия и следващите аутопсията процедури, описани в следващите точка. За животните от индикаторната група може да се изисква аутопсия за всеки отделен случай, по преценка на ръководителя на изследването.

<sup>(1)</sup> За редица измервания на серума и плазмата, и най-вече за глюкозата, се препоръчва гладуване през нощта. Основната причина за това предпочитание е, че нарасналото вариране, което неминуемо би последвало ако не се прилага гладуване, би могло да замаскира трудно доловими ефекти и да затрудни интерпретирането. От друга страна обаче, гладуването през нощта може да въздейства върху общия метаболизъм на животните и, по-специално при изследване на храненето, може да наруши дневната експозиция на изследвания химикал. Всички животни трябва да се оценяват в едно и също физиологично състояние и следователно е за предпочитане подробни или неврологични оценки да се правят за различен ден от пробовземането за клиничната биохимия.

48. Теглото на органите следва да се измерва при всички животни, различни от изключените по последната част от точка 47. Надбъбречните жлези, мозъкът, епидидимите, сърцето, бъбреците, черният дроб, яйчниците, далакът, тестисите, щитовидната жлеза (претеглена след фиксиране, с околощитовидни жлези), и матката на всички животни (освен тези, които са намерени умиращи и/или междуременно умъртвени) следва да бъдат почистени от каквато и да е допълнителна тъкан, според случая, и да бъде установено мокрото им тегло възможно най-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването им.
49. Следните тъкани следва да бъдат консервирани в среда за фиксиране, най-подходяща както за вида тъкан, така и за очакваното последващо хистопатологично изследване (40) (тъканите в средни скоби са по избор):

всички макроскопски увреждания	сърце	панкреас	стомах (предстомах, жлезист стомах)
надбъбречна жлеза	илеум	околощитовидна жлеза	[зъби]
аорта	празно черво	периферен нерв	тестис
мозък (включително срезове от главния мозък, малкия мозък и моста)	бъбреци	хипофиза	тимус
цекум	слъзна жлеза (клепачна)	простатна жлеза	щитовидна жлеза
шийка на матката	черен дроб	право черво	[език]
коагулираща жлеза	бял дроб	слюнчена жлеза	трахея
колон	лимфни възли (както повърхностни, така и дълбоки)	семенно мехурче	пикочен мехур
дванадесетопръстник	млечна жлеза (задължителна за женските и — ако очевидно може да им бъде извършена дисекция — от мъжките)	скелетен мускул	матка (включително шийката)
епидидим	[горни дихателни пътища, включително нос, спирални кости на носа и допълнителни околоносни кухини]	кожа	[уретер]
око (включително ретина)	хранопровод	гръбначен мозък (на три нива: шийно, гръдно и поясно ниво)	[уретра]
[бедрена кост и става]	[обонятелна луковица]	далак	влагалище
жлъчен мехур (за видове, различни от плъх)	яйчници	[гръдна кост]	срез от костен мозък и/или костномозъчен аспират, прясно фиксиран
Хардцова жлеза			

В случай на чифтен орган, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се консервират и двата органа. Клиничните и другите сведения могат да посочат необходимостта от изследвания на допълнителни тъкани. Също така всички органи, които на основата на познатите свойства на изпитвания химикал се считат за вероятни прицелни органи, също следва да бъдат консервирани. При изследвания, включващи дермален път на прилагане, следва да бъдат консервирани органите, посочени в списъка за прилагане по орален път, като е необходимо специфично вземане на проби и консервиране на кожа от мястото на прилагане. При изследвания по инхалаторен път списъкът с тъканите от дихателните пътища за консервиране и изследване следва да е в съответствие с препоръките от глави Б.8. от настоящото приложение (9) и Б.29. от настоящото приложение (10). По отношение на други органи/тъкани (и в допълнение към специално консервираните тъкани от дихателните пътища) органите, които следва да бъдат изследвани, са посочени в списъка за прилагане по орален път.

#### Хистопатология

50. Достъпни са насоки относно най-добрите практики при провеждането на изследвания на токсикологичната патология (40). Минималните хистопатологични изследвания следва да бъдат:

— всички тъкани от животните от групата с висока доза и от контролната група,

- всички тъкани от животните, които са в терминално състояние или са умъртвени по време на изследването,
- всички тъкани, при които се наблюдават макроскопски аномалии,
- прицелните тъкани или тъканите, които в групата с най-висока доза са показали свързани с третирането изменения, от всички животни във всички групи с доза, различна от най-високата,
- в случай на чифтен орган, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се изследват и двата органа.

#### НАБЛЮДЕНИЯ (ФАЗА ЗА КАНЦЕРОГЕННОСТ)

51. Всички животни трябва да бъдат проверени за заболяемост или смъртност, обикновено в началото и в края на всеки ден, включително в съботни и неделни дни и празници. Животните следва допълнително да бъдат проверявани веднъж на ден за специфични сигнали от токсикологична значимост. В случай на изследване с хранене през сонда, животните трябва да бъдат прегледани през периода, непосредствено следващ дозирането. Специално внимание трябва да се обърне на развитието на тумори: трябва да се регистрират времето на поява, локализацията, размерите, външният вид и развитието на всички тумори, които могат да бъдат видяни и опипани при макроскопско изследване.
52. Всички животни трябва да бъдат претегляни в началото на третирането, след това най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Измерването на консумацията на храна и на усвояването на храната следва да се извършва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Консумацията на вода трябва да се измерва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно, ако химикалът се прилага чрез питейната вода. Измервания на консумацията на вода също следва да бъдат предвидени при изследвания, при които питейната активност се изменя.

#### *Хематология, клинична биохимия и други изтвървания*

53. С цел получаване на максимално количество информация от изследването, особено относно съображения за начина на действие, могат да бъдат взети кръвни проби за хематология и клинична биохимия, но това е по преценка на ръководителя на изследването. Изследване на урината може също да е подходящо. Данни за животните, използвани през фазата за хронична токсичност от изследването, обичайно с продължителност 12 месеца (точка 34), предоставят информация относно тези параметри. Допълнителни насоки относно стойността на вземането на такива проби като част от изследване за канцерогенност са представени в Ръководство № 116 (7). Ако се вземат кръвни проби, същите следва да бъдат събрани в края на периода на изпитването, непосредствено преди или като част от процедурата по умъртвяването на животните. Кръвните проби следва да се вземат от избран обект, например чрез сърдечна пункция, или от ретроорбиталния синус, под упойка. Кръвни натривки може също така да се подготвят за изследване, особено ако костният мозък изглежда да е прицелният орган, въпреки че стойността на такава оценка на кръвни натривки във фазата за канцерогенност за оценка на канцерогенния/онкогенния потенциал е под съмнение (38).

#### ПАТОЛОГИЯ

##### *Макроскопска аутопсия*

54. Всички животни, подложени на изследване, с изключение на животни от индикаторна група и други животни от сателитни групи (вж. точка 20), се подлагат на цялостна, подробна макроскопска аутопсия, която включва внимателен преглед на външната повърхност на тялото, всички отвори и черепната, гръдната и коремната кухини и тяхното съдържание. За животни от индикаторна група и други животни от сателитни групи може да се изисква аутопсия въз основа на всеки отделен случай, по преценка на ръководителя на изследването. Претеглянето на органи обичайно не е част от изследването за канцерогенност, тъй като старческите изменения и, на по-късен етап, развитието на тумори, оказват неблагоприятно влияние върху полезността на данните за телото на отделните органи поради невъзможност за разграничаване. Те обаче могат да бъдат от решаващо значение за извършване на оценка на значимостта на доказателствения материал и особено за съображенията относно начина на действие. Ако са част от сателитно изследване, те следва да бъдат събрани не по-късно от една година след началото на изследването.
55. Следните тъкани следва да бъдат консервирани в среда за фиксиране, най-подходяща както за вида тъкан, така и за очакваното последващо хистопатологично изследване (40) (тъканите в средни скоби са по избор):

всички макроскопски увреждания	сърце	панкреас	стوماх (предстомах, жлезист стوماх)
надбъбречна жлеза	илеум	околоштитовидна жлеза	[зъби]
аорта	празно черво	периферен нерв	тестис
мозък (включително срезове от главния мозък, малкия мозък и моста)	бъбреци	хипофиза	тимус
цекум	слъзна жлеза (клепачна)	простатна жлеза	щитовидна жлеза

шийка на матката	черен дроб	право черво	[език]
коагулираща жлеза	бял дроб	сплунчена жлеза	трахея
колон	лимфни възли (както повърхностни, така и дълбоки)	семенно мехурче	пикочен мехур
дванадесетопръстник	млечна жлеза (задължителна за женските и — ако очевидно може да им бъде извършена дисекция — от мъжките)	скелетен мускул	матка (включително шийката)
епидидим	[горни дихателни пътища, включително нос, спирални кости на носа и допълнителни околоносни кухини]	кожа	[уретер]
око (включително ретина)	хранопровод	гръбначен мозък (на три нива: шийно, гръдно и поясно ниво)	[уретра]
[бедрена кост и става]	[обонятелна луковица]	далак	влагалище
жлъчен мехур (за видове, различни от плъх)	яйчници	[гръдна кост]	срез от костен мозък и/или костномозъчен аспират, прясно фиксиран
Хардцова жлеза			

В случай на чифтен орган, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се консервират и двата органа. Клиничните и другите сведения могат да посочат необходимостта от изследвания на допълнителни тъкани. Всякакви други органи, които на основата на познатите свойства на изпитвания химикал се считат за вероятни прицелни органи, също следва да бъдат консервирани. При изследвания, включващи дермален път на прилагане, следва да бъдат консервирани органите, посочени в списъка за прилагане по орален път, като е необходимо специфично вземане на проби и консервиране на кожа от мястото на прилагане. При изследвания по инхалаторен път списъкът с тъканите от дихателните пътища за консервиране и изследване следва да е в съответствие с препоръките от глави Б.8 от настоящото приложение (8) и Б.29 от настоящото приложение (9). По отношение на други органи/тъкани (и в допълнение към специално консервираните тъкани от дихателните пътища) органите, които следва да бъдат изследвани, са посочени в списъка за прилагане по орален път.

#### Хистопатология

56. Достъпни са насоки относно най-добрите практики при провеждането на изследвания на токсикологичната патология (40). Изследваните тъкани следва да бъдат най-малко:

- всички тъкани от животните от групата с висока доза и от контролната група,
- всички тъкани от животните, които са в терминално състояние или са умъртвени по време на изследването,
- всички тъкани, при които се наблюдават макроскопски аномалии, включително тумори,
- когато свързани с третирането хистопатологични промени се наблюдават в групата с най-висока доза, същите тези тъкани трябва да бъдат изследвани върху всички животни от групите с всички дози, различни от най-високата,
- в случай на чифтни органи, например бъбреци и надбъбречни жлези, следва да се изследват и двата органа.

#### ДАНИИ И ДОКЛАДВАНЕ (КАНЦЕРОГЕННОСТ И ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ)

##### Данни

57. Следва да бъдат посочени индивидуални данни за животните за всички оценени параметри. Допълнително всички данни следва да се обобщят в таблична форма, показваща за всяка изпитвана група броя на животните при започване на изпитването, броя на животните, които са открити мъртви по време на изследването или са били умъртвени по хуманни причини, и времето на смъртта или умъртвяването по хуманни причини, броя на животните с проявени признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето на започването, продължителността и силата на всички токсични въздействия, броя на животните с увреждания, типа на уврежданията и процента на животните, показващи всеки отделен тип увреждане. В таблици с обобщени данни следва да се посочат средните стойности и стандартните отклонения (за непрекъснатите данни от изпитвания) при животни, показващи токсично въздействие или при които са налице увреждания, в допълнение към степенуването на уврежданията.

58. Контролните данни за минали периоди могат да бъдат полезни при интерпретирането на резултатите от изследването, например в случай, когато има признаци, че данните, предоставени от паралелни контроли, показват съществено несъответствие при сравнение с актуални данни от контролни животни от една и съща извършваща изпитвания лаборатория/колония. Ако контролните данни за минали периоди са оценени, следва да се представят от същата лаборатория, да се отнасят за животни на една и съща възраст и от една и съща порода, и да са генерирани през петте години, предхождащи съответното изследване.
59. Където е приложимо, числовите резултати следва да се оценяват чрез използване на подходящ и общоприет статистически метод. Статистическите методи и данните, които следва да се анализират, трябва да се избират по време на планирането на изследването (точка 9). Изборът трябва да предвижда възможност за корекция за преживяемост, ако е необходимо.
60. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

*Изпитван химикал:*

- физическа природа, чистота и физични и химични свойства,
- данни за идентифициране на химикала,
- източник на химикала,
- номер на партидата,
- сертификат за химичен анализ.

*Носител (когато се използва такъв):*

- обосновка за избора на носител (когато носителят е различен от вода).

*Изпитвани животни:*

- използван вид/порода и обосновка за направения избор,
- брой, възраст и пол на животните в началото на изпитването,
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.,
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването.

*Условия на изпитването:*

- обосновка за пътя на прилагане и избора на доза,
- когато е приложимо, използваните статистически методи за анализ на данните,
- подробна информация за състава на изпитвания химикал/изготвянето на хранителния режим,
- аналитични данни за достигната концентрация, стабилност и хомогенност на сместа,
- път на прилагане и подробна информация за прилагането на изпитвания химикал,
- за изследвания по инхалаторен път, дали е само през носа, или на цялото тяло,
- действителните дози (mg на kg телесно тегло дневно) и коефициент на превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода (mg на kg или ppm) в действителна доза, ако е приложимо,
- подробна информация за качеството на храната и водата за пиене.

Резултати (следва да се представят обобщени таблични данни и индивидуални данни за животните):

*Общи положения*

- данни за преживяемостта,
- телесно тепло/промени в телесното тепло,
- консумация на храна, изчисления на усвояването на храната, ако са извършени, и потребление на вода, ако е приложимо,
- токсикокинетични данни (ако са налични),
- офталмоскопия (ако е налична),
- хематология (ако е налична),
- клинична химия (ако е налична);

*Клинични находки*

- признаци на токсичност,
- поява (и сила, ако е степенувана) на всякакви аномалии,
- природа, сила и продължителност на наблюдаваните клинични признаци (независимо обратими или необратими);

*Данни от аутопсията*

- телесната маса при настъпване на смъртта,
- тегло на органите и техните съотношения, ако е приложимо,
- находки при аутопсията; поява и сила на аномалиите.

*Хистопатология*

- хистопатологични находки, които не се отнасят до новообразувания,
- хистопатологични находки, които се отнасят до новообразувания,
- съответствие между находките от макроскопското и микроскопското изследване,
- подробно описание на всички свързани с третирането хистопатологични находки, включително степенуването на силата,
- отчет за всякакви партньорски проверки на предметни стъкла.

*Статистическа обработка на резултатите, където е приложимо*

*Обсъждане на резултатите, включително:*

- Обсъждане на всякакви подходи за моделиране
- Зависимости доза-отговор
- Контролни данни за минали периоди

— Разглеждане на всякаква информация, свързана с начин на действие

— Определяне на BMD, NOAEL или LOAEL

— Относителност към човека

Заклучения

#### ПРЕПРАТКИ:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445
- (6) Глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“).
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment № 116, available on the OECD public website for Test Guideline at [www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines).
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Глава Б.8 от настоящото приложение („Субакутна инхалаторна токсичност: 28-дневно изследване“).
- (10) Глава Б.29 от настоящото приложение („Субхронична инхалаторна токсичност: 90-дневно изследване“).
- (11) Глава Б.9 от настоящото приложение („Токсичност (дермална) с многократни дози (28 дни)“).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.



- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment № 35 and Series on Pesticides № 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.
- (27) Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication № 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document № 60.
- (33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

- 
- (34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (39) (Проект на) документ на Европейска агенция по лекарствата „Неклинични насоки относно хепатотоксичността, индуцирана от лекарствени продукти“ (док. № EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Изпитван химикал:** всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.“

(7) Глава Б.36 се заменя със следното:

**„Б.36. ТОКСИКОКИНЕТИКА**

## УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 417 на ОИСР (ОИСР TG 417) (2010 г.). Изследванията, изучаващи токсикокинетиката (ТК) на даден изпитван химикал, се провеждат с цел да се получи подходяща информация относно неговите абсорбция, разпределение, биотрансформация (т.е. метаболизъм) и екскреция, за подпомагане свързването на концентрацията или дозата с наблюдаваната токсичност, и за подпомагане разбирането на неговия механизъм на токсичност. ТК може да допринесе за разбирането на токсикологичните изследвания, като докаже, че изпитваните животни са системно експонирани на изпитвания химикал, и като разкрие кои са частите, които са в циркулация (изходен химикал/метаболити). Основните ТК параметри, определени от тези изследвания, предоставят също така информация по отношение на потенциала за натрупване на изпитвания химикал в тъкани и/или органи и на потенциала за предизвикване на биотрансформация в резултат на експозиция на изпитвания химикал.
2. ТК данни могат да допринесат за оценката на адекватността и относимостта на данните за токсичност от животни за екстраполация за опасността и/или оценката на риска за човека. В допълнение, токсикокинетичните изследвания могат да предоставят полезна информация за определяне нивата на доза за изследванията за токсичност (линейна срещу нелинейна кинетика), ефектите от пътя на прилагане, бионаличността, както и за въпроси във връзка с плана на изследването. Някои видове ТК данни могат да се използват при разработване на физиологично характеризирани токсикокинетични (РВТК) модели.
3. Съществуват важни приложения за данните за метаболити/ТК, като предлагане на възможни видове токсичност и начини на действие и тяхната връзка с нивото на доза и пътя на експозиция. В допълнение, данните за метаболизма могат да предоставят полезна информация за оценка на токсикологичната значимост на експозициите на екзогенно генерирани метаболити на изпитвания химикал.
4. Адекватни токсикокинетични данни ще бъдат от полза да се подпомогне по-нататъшното приемане и прилагане на количествените зависимости структура-активност, подходите на съпоставяне или групиране при оценката на безопасността на химикалите. Данните от кинетиката могат също така да бъдат използвани при оценка на относимостта, в токсикологично отношение, на други изследвания (например *in vivo/in vitro*).
5. Освен ако е посочен друг път на експозиция (вж. по-специално точка 74—78), настоящият метод за изпитване се отнася за орален път на прилагане на изпитвания химикал.

## ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

6. В нормативните уредби се съдържат различни изисквания и нужди по отношение на измерването на крайните точки и параметрите, свързани с токсикокинетиката за различните класове химикали (напр. пестициди, биоциди, промишлени химикали). За разлика от повечето методи за изпитване настоящият метод за изпитване описва изпитването на токсикокинетиката, което включва множество измервания и крайни точки. В бъдеще могат да бъдат разработени няколко нови методи за изпитване и/или ръководства, за отделно и по-подробно описване на всяка крайна точка. При настоящия метод за изпитване изискванията и/или нуждите на всяка конкретна нормативна уредба определят какви изпитвания или оценки ще се извършват.
7. Съществуват многобройни изследвания, които биха могли да се провеждат с цел оценка на токсикокинетичното поведение на даден изпитван химикал за регулаторни цели. Въпреки това, в зависимост от определени регулаторни нужди или ситуации, не всички от тези изследвания могат да бъдат необходими за оценка на изпитвания химикал. При планирането на токсикокинетични изследвания са необходими гъвкавост и съобразяване с характеристиките на изпитвания химикал, който е обект на проучване. В някои случаи може е необходимо проучване само на определен набор от въпроси за преодоляване на загрижеността по отношение на свързаните с изпитвания химикал опасност и риск. В някои ситуации ТК данни могат да се събират като част от оценката в други токсикологични изследвания. За други ситуации може да се окаже необходимо провеждането на допълнителни и/или по-изчерпателни ТК изследвания, в зависимост от регулаторните нужди и/или ако като част от оценката на изпитвания химикал се появят нови въпроси.
8. Цялата налична информация за изпитвания химикал и относимите метаболити и анализи следва да бъде разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждане на изследването, с цел повишаване качеството на изследването и свеждане до минимум на използването на животни. Това би могло да включва данни от други относими методи за изпитване (изследвания *in vivo*, изследвания *in vitro* и/или оценки *in silico*). Физичните и химичните свойства, като например коефициентът на разпределение октанол/вода (изразен като

$\log P_{OW}$ ), рКа, разтворимостта във вода, парното налягане и молекулната маса на даден химикал, могат да бъдат полезни при планирането на изследването и при интерпретирането на резултатите. Те могат да бъдат определени с използване на подходящи методи, както са описани в относимите методи за изпитване.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

9. Настоящият метод за изпитване не е разработен така, че да взема предвид специални обстоятелства, като например бременни или кърмещи животни и тяхното потомство, както и чрез него да се извършва оценка на потенциалните остатъчни вещества в експонирани животни, отглеждани за производство на храни. Въпреки това, данните, получени от изследване по Б.36, могат да предоставят съпътстваща информация с цел да се дадат насоки за планиране на специфични изследвания за тези проучвания. Настоящият метод за изпитване не е предназначен за изпитване на наноматериали. Доклад за предварителния преглед на указания на ОИСП за приложимостта им към наноматериалите показва, че TG 417 (равностоен на настоящия метод за изпитване Б.36) не може да се прилага по отношение на наноматериали (1).

#### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

10. Определенията, използвани за целите на настоящия метод за изпитване, са дадени в допълнение.

#### СЪОБРАЖЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ХУМАННОТО ОТНОШЕНИЕ КЪМ ЖИВОТНИТЕ

11. Насоки за хуманно отношение към животните са на разположение в Ръководство № 19 на ОИСП (GD 19) (2). Препоръчва се ОИСП GD 19 да бъде консултирано при всички изследвания *in vivo* и *in vitro*, описани в настоящия метод за изследване.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

##### Пилотни изследвания

12. Използването на пилотни изследвания се препоръчва и насърчава за избор на опитни параметри за токсикокинетичните изследвания (например метаболизъм, масов баланс, аналитични процедури, определяне на доза, издишване на  $CO_2$  и др.). За характеризирането на някои от тези параметри може да не се изисква използване на белязани химикали.

##### Избор на животните

###### Вид

13. Животинският вид (и порода), използван за ТК изпитване трябва, за предпочитане, да бъде същият като този, използван в други токсикологични изследвания, проведени с представляващия интерес изпитван химикал. Обичайно следва да се използват плъхове, тъй като същите са широко използвани за токсикологични изследвания. Използването на други или допълнителни животински видове може да бъде основателно, ако токсикологични изследвания от особена важност демонстрират доказателство за значителна токсичност при тези видове или ако е доказано, че тяхната токсичност/токсикокинетика е относима в по-голяма степен към човека. Трябва да бъдат представена обосновка за избора на животинския вид и породата от него.
14. Освен ако не е упоменато друго, настоящият метод за изпитване се отнася за плъховете като изследван вид. Възможно е да се наложи някои от аспектите на метода да бъдат изменени за използване на други животински видове за изпитването.

###### Възраст и порода

15. Следва да се използват млади, здрави полово зрели животни (обикновено на възраст от 6 до 12 седмици към времето на дозирането) (вж. също точки 13 и 14). Необходимо е да се даде обосновка за използването на животни, които не са млади и полово зрели. Всички животни трябва да бъдат на подобна възраст в началото на изследването. Колебанията в теглото на отделните животни следва да не превишават  $\pm 20\%$  от средното тегло на изпитваната група. В идеалния случай използваната порода следва да е същата като използваната за създаването на базата данни за изпитвания химикал.

###### Брой и пол на животните

16. Минимум четири животни от един и същ пол следва да се използват за всяка изпитвана доза. Необходимо е да се даде обосновка за пола на използваните животни. Използването на двата пола (четири мъжки и четири женски животни) следва да се разгледа, ако има доказателство в подкрепа на значителни разлики по отношение на токсичността, свързани с пола.

###### Условия на отглеждане и хранене

17. Животните по принцип следва да се настаняват отделно по време на периода на изпитване. Настаняване в група може да бъде обосновано при конкретни обстоятелства. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина/12 часа тъмнина. Температурата на помещението, в което се отглеждат опитните животни, следва да бъде  $22\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ ), а относителната влажност —  $30\text{—}70\%$ . За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене.

**Изпитван химикал**

18. Следва да се използва белязан изпитван химикал, съдържащ  $^{14}\text{C}$ , за всякакви аспекти от изследването, свързани с определянето на масов баланс и идентифицирането на метаболити; ако обаче може да се докаже, че:

- определянето на масов баланс и идентифицирането на метаболити могат да бъдат адекватно оценени с използване на небелязан изпитван химикал,
- аналитичната специфичност и чувствителността на използвания метод с нерадиоактивен изпитван химикал е равна или по-голяма от тази, която би могла да бъде получена с използване на белязания изпитван химикал,

тогава не е нужно да се използва белязан изпитван химикал. Освен това могат да бъдат използвани други радиоактивни и стабилни изотопи, особено ако елементът е отговорен за или се намира в токсичната част на изпитвания химикал. Ако е възможно, радиомаркерът следва да бъде разположен в основна и метаболитно стабилна част от молекулата (не може да бъде заместен или елиминиран по метаболитен път като  $\text{CO}_2$  и не става част от съдържащите един въглероден атом групи в организма). Белязването на множество места или специфични области от молекулата може да бъде необходимо, за да се следи метаболитната съдба на изпитвания химикал.

19. Белязаните и небелязаните изпитвани химикали следва да се анализират чрез използване на подходящи методи за установяване на чистотата и идентичността. Чистотата на радиоактивния изпитван химикал следва да бъде най-високата постижима за даден изпитван химикал (в идеалния случай тя трябва да е над 95 %) и следва да се положат разумни усилия за идентифициране на примеси със съдържание 2 или повече процента. Чистотата, заедно с идентичността и процентното съдържание на всякакви примеси, които са идентифицирани, следва да се докладват. Отделни регулаторни програми могат да изберат да предоставят допълнителни насоки, които да послужат при определянето и спецификациите на състоящите се от смеси изпитвани химикали, и при методите за определяне на чистотата.

**Избор на доза***Пилотно изследване*

20. Обикновено еднократна орална доза е достатъчна за пилотното изследване. Дозата трябва да не е токсична, но да е достатъчно висока, за да позволи идентифициране на метаболити в екскрети (и плазма, ако е подходящо), както и да съответства на оповестената цел на пилотното изследване, както е отбелязано в точки 12 от настоящия метод за изпитване.

*Основни изследвания*

21. За основните изследвания се предпочитат най-малко две дози, тъй като информацията, получена от най-малко две групи на определена доза може да допринесе за определяне на дозата при други изследвания за токсичност, както и да помогне при оценката на зависимостта доза-отговор на вече достъпни изпитвания за токсичност.
22. Когато се прилагат две дози, и двете дози трябва да са достатъчно високи, за да позволят идентифицирането на метаболити в екскретите (и в плазмата, ако е подходящо). Информацията от наличните данни за токсичност следва да бъде разглеждана за избора на доза. Ако няма налична информация (напр. от изследвания за остра орална токсичност, при които са отбелязани клинични признаци на токсичност, или от изследвания за токсичност при повтаряща се доза) могат да бъдат взети предвид стойности за по-високата доза, които да са под очакваните стойности на  $\text{LD}_{50}$  (по орален и дермален път) или  $\text{LC}_{50}$  (по инхалаторен път) или под по-ниската стойност на обхвата при остра токсичност. По-ниската доза следва да бъде част от по-високата доза.
23. Ако се изследва само едно ниво на доза, в идеалния случай дозата трябва да е достатъчно висока, за да позволи идентифицирането на метаболити в екскретите (и в плазмата, ако е подходящо), без да предизвиква видима токсичност. Евентуално невключване на второ ниво на доза следва да бъде обосновано.
24. Ако трябва да бъде установено въздействието на дозата върху кинетичните процеси, две дози може да са недостатъчни и най-малко една доза следва да бъде достатъчно висока за насищане на тези процеси. Ако площта под кривата на плазмената концентрация във времето (AUC) е нелинейна между две нива на доза, използвани в основното изследване, това е ясен признак, че някъде между двете нива на доза има насищане на един или повече от кинетичните процеси.
25. За изпитвани химикали с ниска токсичност следва да се използва максимална доза от 1 000 mg на kg телесно тегло (при прилагане по орален или дермален път) (ако прилагането е по инхалаторен път, вижте глава Б.2 от настоящото приложение за указания; обикновено тази доза не трябва да надвишава 2 mg/l). Порад специфични за съответния химикал съображения може да се наложи по-висока доза в зависимост от регулаторните нужди. Изборът на доза следва винаги да се обосновава.

26. Данните за токсикокINETИЧНОТО разпределение и разпределението в тъканите могат да бъдат подходящи за определяне на потенциала за натрупване и/или устойчивост. Въпреки това при някои обстоятелства може да се наложи прилагане на повтаряща се доза i) с цел по-цялостно съобразяване с потенциала за натрупване и/или устойчивост, или с промените в ТК (т.е. например ензимна индукция и инхибиция), или ii) съгласно изискванията на приложимата нормативна уредба. При изследвания, включващи повтарящо се дозиране, независимо че прилагане на повтарящи се ниски дози обичайно е достатъчно, при определени обстоятелства прилагане на повтарящи се високи дози може също така да бъде необходимо (вж. също параграф 57).

#### Прилагане на изпитвания химикал

27. Изпитваният химикал следва да бъде хомогенно разтворен или в суспензия в същия носител, използван на другите изследвания за орална токсичност чрез хранене през сонда, проведени с изпитвания химикал, ако е достъпна такава информация за носителя. Следва да бъде предоставена обосновка за избора на носител. Изборът на носителя и обема на дозирането следва да бъдат разглеждани при планирането на изследването. Обичайният начин на прилагане е чрез сонда; независимо от това прилагането чрез желатинови капсули или като смес с храната може да има предимства в специфични ситуации (и в двата случая трябва да бъде дадена обосновка). Трябва да се осигури проверка на действителната доза, приложена на всяко животно.
28. Максималният обем течност за всяко отделно орално прилагане чрез сонда зависи от телесното тегло на опитните животни доза, типа на носителя на дозата, и от това дали даването на храна е преустановено преди прилагане на изследвания химикал. Трябва да се предостави обосновка за прилагане или ограничаване на храната преди дозирането. Обикновено обемът следва да се поддържа с възможно най-ниска стойност както за воден носител, така и за различни от вода носители. Обемите на дозата обикновено не следва да надвишават 10 ml на kg телесно тегло за гризачи. Стойностите на обемите на носители, използвани за по-липофилни изпитвани химикали, могат да започнат с 4 ml на kg телесно тегло. За повтарящо се дозиране, когато би имало противопоказание за дневното гладуване, следва да бъдат разглеждани по-ниски стойности на обемите на дозата (например 2—4 ml на kg телесно тегло). Когато е възможно, може да се обмисли използването на обем на дозата на даден изпитван химикал, съответстващ на прилагания в други изследвания за орална токсичност през сонда.
29. За установяване на бионаличността или относителната орална абсорбция могат да бъдат използвани интравенозно (ИВ) прилагане на изпитвания химикал и измерване на изпитвания химикал в кръвта и/или в екскрети. За ИВ изследването се прилага еднократна доза (обичайно равностойна на по-ниската доза по орален път, но без да я превишава – вж. избор на доза) от изпитвания химикал с използването на подходящ носител. Този материал трябва да бъде приложен в подходящ обем (например 1 ml на kg телесно тегло) в избраното място на прилагане на поне четири животни от подходящия пол (и двата пола могат да бъдат използвани, ако има основания за това, вж. точка 16). За ИВ прилагане на изпитвания химикал е необходима смес, в която дозата да е напълно разтворена или суспендирана. Носителят за ИВ прилагането не следва да въздейства върху интегритета на кръвните клетки или кръвотока. Ако изпитваният химикал се прилага чрез инфузия, скоростта на инфузията следва да бъде докладвана и стандартизирана между животните, при условие че се използва инфузионна помпа. Ако се каниюлира югуларната вена (за прилагане на изпитвания химикал и/или за вземане на кръв) или ако за прилагане се използва феморалната артерия, следва да се използва анестезия. Трябва да бъде отделено необходимото внимание на типа анестезия, тъй като той може да окаже въздействие върху токсикокINETИКАТА. На животните трябва да се даде възможност да се възстановят адекватно преди прилагането на изпитвания химикал заедно с носителя.
30. Други пътища на прилагане, например дермален и инхалационен (вж. точки 74—78) могат да бъдат приложими за определени изпитвани химикали, като се отчитат техните физични и химични свойства и очакваната хуманна употреба или експозиция.

#### Измервания

##### Масов баланс

31. Масовият баланс се определя чрез сумиране на процентите на приложената (радиоактивна) доза, екскретирана в урината, в изпражненията и в издишания въздух, както и процентите, присъстващи в тъканите, в остатъчния труп и в течността от измиването на клетката (вж. точки 46). Обичайно общото възстановяване на приложената изпитван химикал (радиоактивност) от порядъка на над 90 % се смята за задоволително.

##### Абсорбция

32. Първоначалната оценка на абсорбцията може да бъде постигната чрез изключване на процента на дозата в стомашно-чревния (СЧ) тракт и/или изпражненията при определяне на масовия баланс. За изчисляване на процента на абсорбция вж. точки 33. За изследване на екскретите вж. точки 44—49. Ако точната степен на абсорбция след дозиране по орален път не може да бъде установена след изследване на масовия баланс (например, когато в изпражненията е налична над 20 % от приложената доза), могат да се окажат необходими допълнителни проучвания. Тези изследвания могат да включват или 1) прилагане по орален път на изпитвания химикал и измерване на изпитвания химикал в жлъчката, или 2) орално и интравенозно прилагане на изпитвания химикал и измерване на нетния изпитван химикал, наличен по всеки от двата пътя на прилагане едновременно в урината, издишания въздух и трупа. Във всеки от плановете на изследването измерването на радиоактивността се извършва като метод с използване на сурогат за специфичен за химикала анализ на изпитвания химикал плюс метаболитите.
33. Ако се извършва изследване на жлъчна екскреция, обичайно се използва орален път за прилагане. При посоченото изследване жлъчните канали на най-малко четири животни от подходящия пол (или от двата пола, ако има основание) следва да бъдат каниюлирани, и следва да бъде приложена еднократна доза от изпитвания химикал. След прилагането на изпитвания химикал, екскрецията на радиоактивност/изпитван химикал в жлъчката следва да бъде наблюдавана толкова дълго, колкото е необходимо за оценка на процентния дял от приложената доза, който се отделя по този път, като тя може да се използва за пряко изчисляване на степента на оралната абсорбция, както следва:

Процент абсорбция = (количество едновременно в жлъчка, урина, издишан въздух и труп без да се отчита съдържанието в стомашно-чревния тракт)/приложено количество × 100

34. При някои класове от изпитвания химикал може да се получи пряко секретирание на абсорбираната доза през чревните мембрани. В такива случаи измерването на процента доза в изпражненията след орална доза при плъхове с канолиран жлъчен канал не се счита за представително по отношение на неабсорбираната доза. Когато се предполага, че протича чревна секреция, се препоръчва процентът на абсорбираната доза да се основава на абсорбция, изчислена от сравнението на екскрецията след прилагането по орален път спрямо същата по интравенозен път (плъх, чийто жлъчен канал не е канолиран или плъх с канолиран жлъчен канал) (вж. точки 35). Когато количественото определяне на чревната секреция се счита за необходимо, препоръчва се също така измерване на екскрецията при плъх с канолиран жлъчен канал след доза, приложена по интравенозен път.

#### Бионаличност

35. Бионаличността може да се определи от кинетиката кръв/плазма на групите с прилагане по орален и ИВ път, както е описано в точки 50—52, чрез специфичен химичен анализ на изпитвания химикал и/или съответния(те) метаболит(и) и следователно не изисква безазан изпитван химикал. Изчисляването на бионаличността (F) на изпитвания химикал или съответния(те) метаболит(и) след това може да се извърши както следва:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{ИВ}}) \times (\text{Доза}_{\text{ИВ}}/\text{Доза}_{\text{exp}})$$

където AUC е площта под кривата на плазмената концентрация във времето, а exp е прилаганият при опита път (орален, дермален или инхалаторен).

36. За употреба при оценката на риска на системни ефекти, като цяло бионаличността на токсичния компонент се предпочита пред процентната абсорбция при сравняване на системни концентрации от изследвания върху животни с аналогични данни от биомониторинга от изследвания на експозицията на работници. Ситуацията може да се усложни, ако дозите са в нелинейния обхват и поради това е важно токсикокинетичният скрининг да определя дози в линейния обхват.

#### Разпределение в тъканите

37. Познанието на разпределението в тъканите на даден изпитван химикал и/или метаболитите му е важно за определянето на прицелните тъкани и за разбирането на дълбочинните механизми на токсичността, както и с цел да се получи информация за потенциала за натрупване и устойчивост на изпитвания химикал и метаболитите. Процентът на общата (радиоактивна) доза в тъкани, както и в останалата част от трупа, следва да бъде измерена най-малко при прекратяване на опита, свързан с екскрецията (напр. обикновено до 7 дни след дозата, или по-малко, в зависимост от специфичното поведение на изпитвания химикал). Когато при приключване на изследването в тъканите не е открит изпитван химикал (например, защото изпитваният химикал може да е бил елиминиран преди приключването на изследването поради кратък полуживот), трябва да се вземат мерки да се предотврати погрешно интерпретиране на данните. При тези обстоятелства разпределението в тъканите следва да се изследва по време на най-високата концентрация на изпитвания химикал (и/или метаболит) в кръвта/плазмата ( $T_{\text{max}}$ ) или най-високата стойност на скоростта на екскреция чрез урината, според случая (вж. точки 38). Освен това вземането на тъкани в допълнителни времеви точки може да е необходимо за определяне на разпределението на изпитвания химикал и/или неговите метаболити в тъканите, за оценка на зависимостта от времето (ако е уместно), за подпомагане при установяването на масовия баланс и/или ако това се изисква от компетентен орган. Тъканите, които трябва да се вземат, включват черен дроб, мастна тъкан, стомашно-чревен тракт, бъбрек, далак, цялостна кръв, остатъчен труп, тъкани от прицелни органи и всякакви други тъкани, например щитовидна жлеза, еритроцити, репродуктивни органи, кожа, очи (особено при пигментирани животни), от потенциална значимост за токсикологичната оценка на изпитвания химикал. Следва да бъде разгледан анализ на допълнителни тъкани в същите времеви точки, с оглед максимално използване на животните и в случай, че се наблюдава токсичност за прицелни органи в изследвания за субхронична или за хронична токсичност. Концентрацията на (радиоактивни) остатъчни вещества и съотношенията „тъкан към плазма“ („тъкан към кръв“) следва също да бъдат докладвани.
38. Също така, оценка на разпределението в тъканите в допълнителни времеви точки, като например времето на най-високата концентрация в кръвта/плазмата (например  $T_{\text{max}}$ ) или най-високата стойност на скоростта на екскреция чрез урината, получени от съответните опити, свързани с кинетиката на плазмата/кръвта или с екскрецията, може да е необходима, или да се изисква от компетентен орган. Тази информация може да бъде от полза за разбирането на токсичността и потенциала за натрупване и устойчивост на изпитвания химикал и метаболитите, следва да бъде предоставена обосновка за избора на пробата; пробите за анализ по принцип следва да бъдат същите като посочените по-горе (вж. точки 37).
39. Количествено определяне на радиоактивност за изследване на разпределението в тъканите може да се извършва като се използват дисекция на органи, хомогенизиране, изгаряне и/или разтваряне, последвани от течно-сцинтилационно броене на уловените остатъчни вещества. Някои техники, които понастоящем са на различни етапи на развитие, напр. количествена автордиография на цялото тяло и микроскопска автордиография на рецептори, могат да се окажат полезни за определяне на разпределението на даден изпитван химикал в органи и/или тъкани (3) (4).
40. За пътища на експозиция, различни от орален, следва да бъдат събирани и анализирани специфични тъкани, като например бели дробове при изследвания по инхалаторен път и кожа при изследвания по дермален път. Вж. точки 74—78.

*Метаболизъм*

41. Екскрети (и плазма, ако е целесъобразно) следва да се събират за идентификация и количествено определяне на непроменен изпитван химикал и на метаболити, както е описано в точки 44—49. Допуска се обединяване на екскрети за улесняване идентифицирането на метаболити в рамките на група с определена доза. Препоръчва се метаболитно профилиране от всеки период от време. Ако обаче поради липса на проба и/или радиоактивност се изключва такава възможност, обединяването на урина и изпражнения от няколко времеви точки е приемливо, но обединяването между различни полове или дози не е приемливо. Следва да се използват подходящи качествени и количествени методи за анализ на урина, изпражнения, радиоактивност на издишания въздух от третиран животни, и жлъчка, според случая.
42. Следва да бъдат положени разумни усилия за идентифициране на всички метаболити със съдържание 5 % от приложената доза или по-високо, и за осигуряване на схема на метаболизма за изпитвания химикал. Изпитваните химикали, които са характеризирани в екскрети като съдържащи 5 % или повече от приложената доза, следва да бъдат идентифицирани. Идентификацията се отнася до точното структурно определяне на компонентите. Обикновено идентификацията се извършва или чрез кохроматография на метаболита с известни еталони, като се използват две отличаващи се една от друга системи, или чрез техники, чрез които може да бъде извършена идентификация на структурата, като маспектрометрия, ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) и т.н. В случай на кохроматография хроматографски техники, използващи същата стационарна фаза с две различни системи разтворители, не се смятат за адекватна проверка на идентичността на метаболита чрез два метода, тъй като методите не са независими. Идентификацията чрез кохроматография следва да бъде извършена посредством използването на две отличаващи се една от друга аналитично независими системи, като обратнофазова и нормалнофазова тънкослойна хроматография (TLC) и високоефективна течна хроматография (HPLC). Ако хроматографското отпеление е с подходящо качество, тогава допълнително потвърждение със спектроскопски средства не е необходимо. Като алтернатива, еднозначно идентифициране може също да бъде получено чрез използването на методи, предоставящи информация за структурата, като например: течна хроматография/маспектрометрия (LC-MS), или течна хроматография/тандем маспектрометрия (LC-MS/MS), газова хроматография/маспектрометрия (GC-MS), и ЯМР спектрометрия.
43. Ако идентифициране на метаболитите при 5 % или повече от приложената доза не е възможно, трябва да бъде представена обосновка/обяснение в окончателния доклад. Може да е уместно да се идентифицират метаболитите, представляващи по-малко от 5 % от приложената доза за по-добро разбиране на метаболитния път за оценка на опасността и/или риска от изпитвания химикал. Когато е възможно следва да бъде представено потвърждение на структурата. Това може да включва профилиране в плазма или в кръв, или в други тъкани.

*Екскреция*

44. Скоростта и степента на екскрецията на приложената доза следва да бъдат определени чрез измерване на процента на възстановената (радиоактивна) доза от урина, изпражнения и издишан въздух. Тези данни също допринасят за изготвяне на масовия баланс. Количествата на изпитвания химикал (радиоактивност), елиминиран в урината, изпражненията и издишания въздух, следва да се определят през подходящи интервали от време (вж. точки 47—49). Опитите с повтаряща се доза следва да бъдат правилно планирани така, че да позволяват събирането на данни за екскрецията за постигане на целите, описани в точки 26. Това ще позволи сравнение с опитите с еднократна доза.
45. Ако пилотно изследване е показало, че от изпитвания химикал (радиоактивност) (съгласно точки 49) не е екскретирано значително количество в издишания въздух, тогава не е необходимо да се събира издишан въздух в окончателното изследване.
46. Всяко животно трябва да се постави в отделно съоръжение за изследване на метаболизма, за събиране на екскрети (урина, изпражнения и издишан въздух). В края на всеки период на събиране (вж. точки 47—49) съоръженията за изследване на метаболизма трябва да се изплакват с подходящ разтворител (това е известно като „измиване на клетката“), за да се гарантира максимално възстановяване на изпитвания химикал (радиоактивност). Събирането на екскрети следва да бъде прекратено след 7 дни, или след като най-малко 90 % от приложената доза е била възстановена, в зависимост от това кое от двете е настъпило по-рано.
47. Общите количества изпитван химикал (радиоактивност) в урината трябва да се определят поне за две времеви точки в ден 1 от събирането, едната от които трябва да бъде 24 часа след дозирането, и след това ежедневно до прекратяване на проучването. Избирането на повече от две времеви точки за пробовземане през първия ден (например в 6, 12 и 24 h) се насърчава. Резултатите от пилотните изследвания следва да бъдат анализирани за информация относно алтернативни или допълнителни времеви точки за събиране. Следва да се представи обосновка за графика за събирането.
48. Общите количества изпитван химикал (радиоактивност) в изпражненията следва да се определят ежедневно с начало 24 часа след дозирането до прекратяване на изследването, освен ако пилотни изследвания не предлагат алтернативни или допълнителни времеви точки за събиране. Следва да се представи обосновка за алтернативни графики за събирането.
49. Събирането на издишания CO<sub>2</sub> и други летливи материали по даден опит от изследването може да се прекрати, когато по-малко от 1 % от приложената доза се намира в издишания въздух по време на 24-часов период на събиране.



**Изследвания на измененията във времето***Кинетика на кръвта/плазмата*

50. Целта на тези изследвания е да се получат оценки на стойностите на основни ТК параметри [напр.  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , полуживот ( $t_{1/2}$ ), AUC] за изпитвания химикал. Тези изследвания могат да се провеждат с една доза или, което е по-вероятно, с две или повече дози. Определянето на дозата следва да се обуславя от естеството на опита и/или от разглеждания въпрос. Данни за кинетиката могат да са необходими за изясняване на въпроси като бионаличността на изпитвания химикал, и/или за изясняване въздействието на дозата върху клирънса (напр. да се изясни дали клирънсът е наситен по зависимост от дозата начин).
51. За тези изследвания следва да се използват най-малко по четири животни от един пол за група с определена доза. Необходимо е да се даде обосновка за пола на използваните животни. Използване на двата пола (четири мъжки и четири женски животни) следва да бъде разглеждано, ако има доказателство в подкрепа на значителни разлики по отношение на токсичността, свързани с пола.
52. След прилагане на изпитвания химикал (белязан), следва да се вземат кръвни проби от всяко животно в подходящи времеви точки, при използване на подходяща методология за пробовземане. Обемът и броят на кръвните проби, които могат да бъдат получени от едно животно, може да бъде ограничен от потенциалните въздействия на повтарящото се пробовземане върху здравето на животните/физиологията и/или чувствителността на метода за анализ. Пробите следва да се анализират за всяко отделно животно. При определени обстоятелства (напр. характеризирани на метаболит) може да е необходимо да се обединят проби от повече от едно животно. Сборните проби следва да бъдат ясно идентифицирани и следва да бъде дадено обяснение за обединяването. Ако е използван белязан изпитван химикал, възможно е да е целесъобразен анализ на общата налична радиоактивност. Ако това е така, общата радиоактивност следва да бъде анализирана в цялостна кръв и плазма, или в плазма и червени кръвни клетки, за да се позволи изчисляване на съотношението кръв/плазма. При други обстоятелства могат да се окажат необходими по-специфични проучвания, изискващи идентифицирането на изходното съединение и/или метаболитите, или за оценка на свързването с белтъци.

*Кинетика в други тъкани*

53. Целта на тези изследвания е да се получи информация за изменения във времето, за да се даде отговор на въпроси, свързани с теми като начина на токсично действие, биоаккумуляцията и биоустойчивостта, чрез определяне на нивата на изпитвания химикал в различни тъкани. Изборът на тъканите и на броя на оценените времеви точки зависи от въпроса, който трябва да бъде разглеждан, и от базата токсикологични данни за изпитвания химикал. При планирането на тези изследвания на кинетиката в допълнителни тъкани следва да се вземе предвид събраната информация, описана в точки 37—40. Тези изследвания биха могли да включват еднократно или повтарящо се дозиране. Използваният подход следва да бъде подробно обоснован.
54. Причините за извършване на изследвания за кинетиката в други тъкани биха могли да включват:
- доказателства за удължен полуживот в кръвта, предполагащи евентуално натрупване на изпитвания химикал в различни тъкани, или
  - интерес да се установи дали е достигнато равнище на постигане на стационарно състояние в специфични тъкани (напр. при изследвания с повтаряща се доза, въпреки че може видимо да е достигнато равнище на постигане на стационарно състояние на изпитвания химикал в кръвта, може да има интерес да се потвърди, че равнище на постигане на стационарно състояние е постигнато също и в прицелни тъкани).

55. За тези типове изследвания на измененията във времето следва да се прилага подходяща орална доза от изпитвания химикал върху най-малко четири животни за дадена доза за времева точка, и да се следят измененията във времето на разпределението в избрани тъкани. Може да се използва само един пол, освен ако се наблюдава токсичност, специфична за отделните полове. Дали се анализира общата радиоактивност или изходният химикал и/или метаболитите също така зависи от разглеждания въпрос. Оценката на разпределението в тъканите трябва да се направи с помощта на подходящи техники.

*Ензимна индукция/инхибиция*

56. Изследвания по отношение на възможните последици от ензимна индукция/инхибиция или биотрансформация на изпитвания химикал, предмет на изследването, могат да са необходими в един или повече от следните случаи:
- 1) достъпни са доказателства, посочващи връзка между биотрансформация на изпитвания химикал и повишена токсичност;
  - 2) достъпните данни за токсичността показват нелинейна зависимост между доза и метаболизъм;
  - 3) като резултат от изследванията за идентифициране на метаболити е идентифициран потенциално токсичен метаболит, който може да е произведен по ензимен път, индуциран от изпитвания химикал;
  - 4) при обясняване на ефекти, за които се приема че са свързани с явления на ензимна индукция;

- 5) ако токсикологично значими промени в метаболитния профил на изпитвания химикал се наблюдават чрез опити или *in vitro*, или *in vivo*, с различни животински видове или при различни условия, може да е необходимо охарактеризиране на включения(те) ензим(и) (например, ензими от фаза I като изоензими на Цитохром Р450-зависимата монооксигеназна система, ензими от фаза II като изоензими на сулфотрансфераза или уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза или всякакви други относими ензими). Тази информация може да бъде използвана за оценка на уместността на екстраполациите от един вид към друг.
57. За оценка на свързаните с изпитвания химикал промени в ТК следва да се използват подходящи, надлежно валидирани и обосновани протоколи за изследвания. Примерни планове за изследвания се състоят от повтарящо се дозиране с небелязан изпитван химикал, последвано от еднократна белязана доза през ден 14, или повтарящо се дозиране с белязан изпитван химикал и пробовземане в дни 1, 7 и 14 за определяне на метаболитни профили. Повтарящото се дозиране с белязан изпитван химикал може също да предостави информация за биоаккумуляцията (вж. точки 26).

#### ДОПЪЛНИТЕЛНИ ПОДХОДИ

58. Допълнителните подходи освен опитите *in vivo*, описани в настоящия метод за изпитване, могат да предоставят полезна информация за абсорбцията, разпределението, метаболизма или елиминирането на даден изпитван химикал в някои видове.

#### Използване на информация от изследвания *in vitro*

59. Няколко въпроса относно метаболизма на изпитвания химикал могат да бъдат разглеждани в изследвания *in vitro*, като се използват подходящи системи за изпитване. Прясно изолираните или култивирани хепатоцити и субклетъчни фракции (напр. микросоми и цитозол или фракция S9) от черен дроб могат да се използват за изследване на възможни метаболити. Локалният метаболизъм в прицелния орган, например бял дроб, може да бъде от интерес за оценка на риска. За тези цели могат да бъдат от полза микросомните фракции от прицелни тъкани. Изследванията с микросоми могат да бъдат от полза за преодоляване на потенциални различия, свързани с пола и жизнения стадий, и за характеризирание на ензимните параметри ( $K_m$  и  $V_{max}$ ), което може да спомогне за оценка на зависимостта на метаболизма от дозата по отношение на нивата на експозиция. В допълнение микросомите могат да бъдат полезни, за да се идентифицират конкретните микросомни ензими, участващи в метаболизма на изпитвания химикал, които могат да бъдат относими към екстраполациите от един вид към друг (вж. също така точки 56). Потенциалът за индукция на биотрансформация може също да бъде изследван чрез използване на субклетъчни фракции (напр. микросоми и цитозол) от черен дроб на животни, предварително третирани с изпитвания химикал, който е обект на интерес, *in vitro* чрез изследвания за хепатоцитна индукция или от специфични клетъчни линии, експресиращи съответни ензими. При определени обстоятелства и при подходящи условия субклетъчните фракции с произход от човешки тъкани могат да бъдат разглеждани с оглед използване при определянето на потенциалните междувидови различия в биотрансформацията. Резултатите от проучванията *in vitro* също могат да допринесат за развитието на PBTK модели (5).
60. Изследванията *in vitro* на дермалната абсорбция могат да предоставят допълнителна информация за характеризирание на абсорбцията (6).
61. Първични клетъчни култури от чернодробни клетки и пресни срезове от тъкани могат да бъдат използвани за разглеждане на сходни въпроси както тези с чернодробни микросоми. В определени случаи може да е възможно да се отговори на специфични въпроси, като се използват клетъчни линии с определена експресия на съответния ензим или създадени чрез генно инженерство клетъчни линии. В някои случаи може да е полезно да се проучи инхибицията и индукцията на специфични Цитохром Р450 изоензими (напр. CYP1A1, 2E1, 1A2 и други) и/или ензими от фаза II от изходното съединение с използване на изследвания *in vitro*. Получената информация може да е полезна за съединения със сходна структура.

#### Използване на токсикокинетични данни от изследвания за токсичност като допълнителна информация

62. Анализът на проби от кръв, тъкани и/или екскрети, взети по време на провеждане на всякакви други изследвания за токсичност, може да предостави данни за бионаличност, изменения във времето на концентрацията в плазмата ( $AUC$ ,  $C_{max}$ ), потенциал за биоаккумуляция, проценти на клирънс и изменения в метаболизма и кинетиката, свързани с пола или жизнения стадий.
63. Разглеждането на плана на изследването може да се използва, за да се отговори на въпроси, свързани с: насищане на пътищата на абсорбция, биотрансформация или екскреция при по-високи нива на доза; функционирането на нови метаболитни пътища при по-високи дози и ограничаването на токсични метаболити до по-високи дози.
64. Други свързани с оценка на опасността съображения биха могли да включват въпроси като:
- свързана с възрастта чувствителност, дължаща се на разликите в състоянието на кръвно-мозъчната бариера, бъбреците и/или капацитета за детоксикация,
  - чувствителност на субпопулациите, дължаща се на разликите в капацитета за биотрансформация или на други токсикокинетични различия,
  - степен на експозиция на химикали на плода по трансплацентарен път, или на новороденото при кърмене.

**Използване на токсикокинетично моделиране**

65. Токсикокинетичните модели могат да бъдат полезни за различни аспекти на оценката на опасността и риска, като например в прогнозиране на системната експозиция и дозата за вътрешни тъкани. Освен това могат да бъдат разглеждани специфични въпроси относно начина на действие и тези модели могат да осигурят основа за екстраполация от един вид към друг, за пътищата на експозиция, за моделите за дозиране и за оценка на риска за човека. Данните от полза за разработването на РВТК модели за даден изпитван химикал, за всякакви животински видове, включват: 1) коефициенти на разпределение, 2) биохимични константи и физиологични параметри, 3) специфични за даден път на прилагане параметри на абсорбция, и 4) кинетични данни *in vivo* за оценка чрез модел [например параметри на клирънса за относителните (> 10 %) пътища на екскреция,  $K_m$  и  $V_{max}$  за метаболизма]. Опитните данни, използвани за разработване на даден модел, следва да се генерират с научнообосновани методи, а резултатите от прилагането на модела следва да бъдат валидирани. Параметрите, специфични за изпитвания химикал и за животинския вид, като процента на абсорбция, разпределението в кръвта и в тъканите, и скоростните константи за метаболизма често се определят с цел улесняване разработването на некомпартментни или физиологично характеризирани модели (7).

**ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ**

66. Препоръчва се докладът от изследването да включва съдържание.

**Основна част на доклада**

67. Основната част на доклада следва да включва информация, обхваната от настоящия метод за изпитване, организирана в раздели и точки, както следва:

*Резюме*

68. Този раздел от доклада от изследването следва да включва резюме на плана на изследването и описание на използваните методи. Той следва също така да очертае ключовите констатации относно масовия баланс, естеството и значимостта на метаболитите, остатъчните вещества в тъканите, скоростта на клирънса, потенциала за биоаккумуляция, разлики между половете и т.н. Резюмето следва да бъде представено достатъчно подробно, за да позволи оценка на констатациите.

*Въведение*

69. Този раздел от доклада следва да включва целите, обосновката и плана на изследването, както и подходящи препратки и всякакъв исторически контекст.

*Материали и методи*

70. Този раздел от доклада следва да включва подробно описание на цялата уместна информация, включително:

## а) Изпитван химикал

Този подраздел следва да включва идентификация на изследвания химикал: химично наименование, молекулна структура, качествено и количествено определяне на неговия химичен състав, химическа чистота и — когато е възможно — тип и количества на всякакви примеси. Той следва да включва още и информация за физичните/химичните свойства, включително агрегатно състояние, цвят, бруто разтворимост и/или коефициент на разпределение, стабилност и, ако е подходящо, корозивност. Ако е приложимо, следва да бъде предоставена информация относно изомери. Ако изпитваният химикал е белязан, в този подраздел трябва да бъде включена следната информация: типа на радионуклида, положение на белязаната част, специфичната активност и радиохимична чистота.

Трябва да бъдат посочени типът или описанието на всякакви носители, разредители, дисперсни среди в суспензии и емулсии, или други материали, използвани при прилагането на изпитвания химикал.

## б) Изпитвани животни

Този подраздел следва да включва информация за изпитваните животни, включително подбор и обосновка за вид, порода и възраст при започване на изследването, пол, както и телесно тегло, здравен статус и отглеждане.

## в) Методи

Този подраздел следва да включва подробности относно плана на изследването и използваната методология. Той следва да включва описание на:

- 1) обосновка за всякакво изменение на пътя и условията на експозиция, ако е приложимо;

- 2) обосновка на избора на нивата на доза;
  - 3) описание на пилотни изследвания, използвани при планиране на опитите в последващите изследвания, ако е приложимо. Следва да бъдат представени подкрепящи данни от пилотното изследване;
  - 4) как е приготвен разтворът с дозата и използваният тип разтворител или носител, ако има такива;
  - 5) брой на групите за третиране и брой на животните в група;
  - 6) нива на дозиране и обем (и специфична активност на дозата, когато се използва радиоактивност);
  - 7) път(ища) и начини за прилагане;
  - 8) честота на дозиране;
  - 9) период на гладуване (ако се прилага);
  - 10) обща радиоактивност за животно;
  - 11) боравене с животното;
  - 12) събиране и обработване на проби;
  - 13) методи за анализ, използвани за разделяне, количествено определяне и идентификация на метаболитите;
  - 14) граница на откриване за използваните методи;
  - 15) други опитни измервания и използвани процедури (включително валидиране на методите за анализ на метаболитите).
- г) Статистически анализ

Ако е използван статистически анализ за анализиране на резултатите от изследването, тогава следва да бъде представена достатъчна информация за използвания метод за анализ и компютърна програма, по такъв начин, че независим проверяващ/статистик да може да оцени повторно и възпроизведе анализа.

В случай на изследвания, включващи моделиране на системи, като например РВТК, представянето на моделите следва да включва пълно описание на модела, за да се даде възможност за независимо възпроизвеждане и валидиране на модела (вж. точка 65 и определенията в допълнението).

#### Резултати

71. Всички данни следва да бъдат обобщени и представени в табличен вид с подходяща статистическа оценка, и описани в текста на настоящия раздел. Данните за измерване на радиоактивността трябва да бъдат обобщени и представени по подходящ за изследването начин, обичайно като микрограм-еквиваленти или милиграм-еквиваленти в масата на пробата, макар че могат да бъдат използвани други единици. Този раздел следва да включва графични илюстрации на констатациите, възпроизвеждане на представителни хроматографски и спектрометрични данни, идентифициране/количествено определяне на метаболити и предложени метаболитни пътища, включително молекулярна структура на метаболитите. Като допълнение в този раздел трябва да бъде включена следната информация, ако е приложимо:

- 1) количество и процент на възстановяване на радиоактивността от урината, изпражненията, издишания въздух и измиването на клетката от урина и изпражнения.

— За изследвания по дермален път се включват също така данни за възстановяването на изпитвания химикал от третираната кожа, промиването на кожата и остатъчната радиоактивност в кожата от апаратурата, съоръжението за изследване на метаболизма, както и резултати от изследването на измиването на кожата. За по-нататъшна дискусия вж. точки 74—77.

— За изследвания по инхалаторен път се включват също така данни за възстановяването на изпитвания химикал от белите дробове и назалните тъкани (8). За по-нататъшна дискусия вж. точки 78;

- 2) разпределението в тъканите, докладвано като процент от приложената доза и като концентрация (микрограм-еквиваленти на грам тъкан), и съотношения „тъкан към кръв“ или „тъкан към плазма“;
- 3) материален баланс, разработен от всяко изследване, включващ анализ на телесни тъкани и екскрети;
- 4) плазмени концентрации и токсикокинетични параметри (бионаличност, AUC,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , клирънс, полу-живот) след прилагането по съответния(те) път(ища) на експозиция;
- 5) скоростта и степента на абсорбция на изпитвания химикал след прилагането по съответния(те) път(ища) на експозиция;
- 6) количествата на изпитвания химикал и метаболитите (докладвани като процент от приложената доза), събрани в екскрети;
- 7) препратка към данни в допълнение, които съдържат индивидуални за отделните животни данни за всички крайни точки на измерване (например прилагане на доза, процент на възстановяване, концентрации, ТК параметри и др.);
- 8) фигура с предложените метаболитни пътища и молекулните структури на метаболитите.

#### Дискусия и заключения

72. В този раздел автора(ите) следва да:

- 1) предоставят предложен метаболитен път въз основа на резултатите от метаболизма и елиминирането на изпитвания химикал;
  - 2) дискутират всякакви потенциални видови и полови различия по отношение на елиминирането и/или биотрансформацията на изпитвания химикал;
  - 3) представят в табличен вид и дискутират идентификацията и значимостта на метаболитите, скоростта на клирънса, потенциала за биоаккумуляция и нивото на остатъчните количества изходен химикал и/или метаболит(и) в тъканите, както и евентуални зависимости от дозата промени в ТК параметри, според случая;
  - 4) включат в този раздел всякакви относими ТК данни, получени в хода на провеждането на изследванията за токсичност;
  - 5) предоставят сбито заключение, което може да бъде подкрепено от констатациите от изследването;
  - 6) добавят раздели (когато е необходимо или уместно).
73. Допълнителните раздели следва да се използват за включване на подкрепяща библиографска информация, таблици, фигури, допълнения и др.

#### АЛТЕРНАТИВНИ ПЪТИЩА НА ЕКСПОЗИЦИЯ

##### Дермален

##### Третиране по дермален път

74. Този раздел предоставя конкретна информация за проучването на токсикокинетиката на изпитвания химикал по дермален път. За дермалната абсорбция следва да бъде консултирана глава Б.44 от настоящото приложение [„Кожна абсорбция: in vivo метод“ (9)]. За други крайни точки, като например разпределението и метаболизма, може да се използва настоящият метод за изпитване Б.36. При третиране по дермален път следва да се използват едно или повече нива на доза за изпитвания химикал. Изпитваният химикал (напр. материал, съдържащ изпитвания химикал, който се прилага върху кожата в чист вид, разреден или приготвен по рецепта) трябва да бъде същият (или реалистичен сурогат) като този, на който могат да бъдат експонирани хора или други потенциални прицелни видове. Нивото(ата) на доза трябва да бъде избирано(и) в съответствие с точки 20—26 от настоящия метод за изпитване. Фактори, които биха могли да бъдат взети предвид при избора на доза за прилагане по дермален път, включват очаквана експозиция на хора и/или дози, при които е наблюдавана токсичност в други изследвания за дермална токсичност. При необходимост дозата(ите) за прилагане по дермален път следва да се разтвори(ят) в подходящ носител и да се приложи(ат) в обем, който е подходящ за поставяне на дозите. Малко преди началото на изпитването се подстригва козината по гръбната част на тялото на опитните животни. Може да се използва бръснене, но то следва да се извършва приблизително 24 часа преди изпитването. При подстригването или бръсненето на козината следва да се внимава да не се увреди кожата, защото

могло да промени нейната пропускливост. Приблизително 10 % от повърхността на тялото трябва да бъде почистена за прилагане на изпитвания химикал. При силно токсични химикали обхванатата повърхност може да бъде по-малка от приблизително 10 %, но колкото е възможно по-голяма площ трябва да бъде покрита с тънък и еднакъв филм. Третираната повърхност следва да е еднаква за всички групи, изпитвани по дермален път. Участците, към които се прилага дозата, трябва да бъдат защитени с подходящо покритие, което е закрепено на място. Животните трябва да бъдат индивидуално настанени.

75. Трябва да се проведе изследване на измиването на кожата, за да се оцени количеството на приложената доза от изпитвания химикал, което може да бъде отстранено от кожата чрез измиване на третирания участък от кожата с мек сапун и вода. Това изследване може да допринесе и за изготвяне на масовия баланс, когато изпитваният химикал се прилага по дермален път. За това изследване на измиването на кожата следва да се приложи еднократна доза от изпитвания химикал на две животни. Изборът на нивото на доза е в съответствие с точки 23 от настоящия метод за изпитване (вж. също точки 76 за дискусия относно времето за контакт с кожата). Количествата на изпитвания химикал, възстановени при измиванията, следва да бъдат определени с цел оценка на ефективността на отстраняването на изпитвания химикал чрез процедурата по измиване.
76. Изпитваният химикал следва да се приложи и задържи върху кожата в продължение на най-малко 6 часа, освен ако това е възпрепятствано от неговата корозивност. При отстраняването на покритието третирана площ трябва да се измие чрез процедурата, изложена в изследването на измиването на кожата (вж. точки 75). Както покритието, така и течността от измиването следва да бъдат анализирани за остатъчни количества от изпитвания химикал. При прекратяване на изследванията всяко животно следва да бъде умъртвено по хуманен начин в съответствие с (2), и третираната кожа следва да бъде отстранена. Подходящ срез от третираната кожа следва да бъдат анализирани за определяне на остатъчен изпитван химикал (радиоактивност).
77. За токсикокинетичната оценка на фармацевтични продукти може да са необходими различни процедури съгласно съответната нормативна уредба.

#### **Инхалаторен път**

78. Следва да се използва само една концентрация на изпитвания химикал (или повече, ако е необходимо). Концентрацията(ите) трябва да бъде избрана(и) в съответствие с точки 20—26 от настоящия метод за изпитване. Третирането по инхалаторен път следва да се провежда с използване на апарати с „конусовидно приспособление, позволяващо експозиция само на носа“ или такива, позволяващи експозиция „само на главата“, за предотвратяване на абсорбция чрез алтернативни пътища на експозиция (8). Ако се използват други условия на експозиция по инхалаторен път, обосновката за изменението трябва да бъде документирана. Трябва да бъде определена продължителността на експозицията по инхалаторен път; една типична експозиция е 4—6 часа.

#### **ПРЕПРАТКИ:**

- (1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials № 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.
- (3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, *J Pharm and Tox Methods* 46: 73-81.
- (4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51: 25-40.
- (5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50: 400 – 411.
- (6) Глава Б.45 от настоящото приложение („Кожна абсорбция: in vitro метод“).
- (7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document № 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

- 
- (9) Глава Б.44 от настоящото приложение („Кожна абсорбция: in vivo метод“).
- (10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), *Pharmacokinetics*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.
-

## Допълнение

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Абсорбция:** Процес(и) на поглъщане на химикали в или през тъканите. Абсорбцията се отнася до изходното съединение и до всички негови метаболити. Да не се бърка с „бионаличност“.

**Натрупване:** (биоаккумуляция): Увеличение, с течение на времето, на количеството изпитван химикал в тъканите (обикновено мастни тъкани, в резултат на повтаряща се експозиция); ако скоростта на въвеждането на даден изпитван химикал в тялото е по-висока от скоростта на елиминирането му, изпитваният химикал се натрупва в организма и могат да бъдат достигнати токсични концентрации от него.

**APME:** Акроним за „Абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция“.

**AUC:** (площ под кривата на плазмената концентрация във времето): Площ под кривата на графиката на концентрацията на изпитвания химикал в плазмата с течение на времето. Тя представлява общото количество от изпитвания химикал, абсорбирано от тялото в рамките на предварително определен период от време. В условия на линейна зависимост AUC (от времева точка нула до безкрайност) е пропорционална на общото количество от изпитвания химикал, абсорбирано от тялото, независимо от скоростта на абсорбция.

**Автордиография:** (автордиография на цялото тяло): Използва се за качествено и/или количествено определяне на разположението на радиоактивен изпитван химикал в тъканите, в тази техника се употребява рентгенов филм или, отскоро, цифрови изображения върху фосфорно покритие, за визуализиране на белязани молекули или фрагменти от молекули чрез записване стойностите на радиацията, излъчвана вътре в изследвания обект. Количествената автордиография на цялото тяло, в сравнение с дисекцията на органи, може да има някои предимства при оценката на разпределението на изпитвания химикал и оценката на общото възстановено количество и на разделителната способност на радиоактивни материали в тъканите. Например, значително предимство е че може да се използва при модели с пигментирани животни за оценка на възможно свързване на изпитвания химикал с меланина, който може да се свързва с някои молекули. Въпреки това, макар че може да осигури удобен преглед на цялото тяло за свързващи места с висок капацитет и нисък афинитет, тази техника може да е с ограничено приложение за разпознаване на специфични прицелни места, като например местата на свързване към рецептор, за откриването на които се изисква относително висока разделителна способност и висока чувствителност. Когато се използва автордиография, опитите, предназначени за определяне на масовия баланс на прилаганото съединение, следва да бъдат проведени като отделна група или в изследване, което е отделно от опита за установяване на разпределението в тъканите, и в което всички екскрети (които могат да включват и издишания въздух) и цели трупове се хомогенизират и се анализират чрез точно-сцинтилационно броене.

**Жлъчна екскреция:** Екскреция чрез жлъчните канали.

**Биоаккумуляция:** Вж. „Натрупване“.

**Бионаличност:** Фракция от приложена доза, която достига до системното кръвообращение или е в наличност на мястото на физиологична активност. Обичайно бионаличността на даден изпитван химикал се отнася за изходното съединение, но би могла да се отнася за негов метаболит. Тя засяга само един химичен вид. *Nota Bene:* бионаличност и абсорбция не са едно и също. Например разликата между орална абсорбция (т.е. присъствие в чревната стена и порталното кръвообращение) и бионаличност (т.е. присъствие в системното кръвообращение и в тъканите) може да възникне от химично разлагане, дължащо се на метаболизма в чревната стена, или транспорта на ефлукс обратно към чревния лумен, или предсистемния метаболизъм в черния дроб, наред с други фактори (10). Бионаличността на токсичния компонент (изходно съединение или метаболит) е особено важен параметър при оценката на риска за човека (екстраполация от висока към ниска доза, екстраполация от един път на експозиция към друг) за определяне на вътрешна стойност от външните NOAEL или BMD (приложена доза). За ефекти върху черния дроб при прилагане по орален път е достатъчна оралната абсорбция. Въпреки това, за всякакви ефекти, различни от тези на портала на въвеждане, като цяло не абсорбцията, а бионаличността е по-надежден параметър за последваща употреба при оценка на риска.

**Биоустойчивост:** Вж. „Устойчивост“.

**Биотрансформация:** (Обикновено ензимно) химично превръщане на представляващ интерес изпитван химикал в друг химикал в тялото. Синоним е на „метаболизъм“.

**C<sub>max</sub>:** Или максимална (върхова) концентрация в кръвта (плазма/серум) след прилагането, или максимална (върхова) екскреция (в урина или изпражнения) след прилагането.

**Скорост на клирънс:** Количествена мярка за скоростта, с която даден изпитван химикал се елиминира от кръвта, плазмата или определена тъкан за единица време.

**Компартмент:** Структурна или биохимична част (или звено) от тяло, тъкан или клетка, която е отделна от останалото.

**Пътища за детоксикация:** Поредица от стъпки, водеща до елиминиране на токсични химикали от тялото или чрез метаболитни изменения, или чрез екскреция.



**Разпределение:** Разпръскване на изпитван химикал и неговите деривати в организма.

**Ензими/изоензими:** Белтъци, които катализират химични реакции. Изоензимите са ензими, които действат като катализатор за подобни химични реакции, но се различават по своята аминокиселинна последователност.

**Ензимни параметри:**  $K_m$ : константа на Михаелис и  $V_{max}$ : максимална скорост.

**Екскреция:** Процес(и), чрез който(ито) приложен изпитван химикал и/или неговите метаболити се отстраняват от тялото.

**Екзогенно:** Въведено отвън или произведено извън организма или системата.

**Екстраполация:** Извод на една или повече неизвестни величини въз основа на това, което е известно или наблюдавано.

**Полуживот ( $t_{1/2}$ ):** Времето, за което концентрацията на изпитвания химикал намалява наполовина в даден компартмент. В типичния случай това понятие се отнася за плазмената концентрация или за количеството изпитван химикал в цялото тяло.

**Индукция/ензимна индукция:** Синтез на ензим в отговор на стимул от околната среда или молекула-индуктор.

**Линейност/линейна кинетика:** Даден процес е линеен в кинетиката, когато всички скорости на преминаване между компартментите са пропорционални на наличните количества или концентрации, т.е. от първи ред. Следователно, обемите на клирънс и разпределението са постоянни, както и стойностите на полуживота. Достигнатите концентрации са пропорционални на величината на дозата за единица време (експозиция), и натрупването е по-лесно прогнозируемо. Линейността/нелинейността може да бъде оценена чрез сравняване на относимите параметри, например AUC, след различни дози или след еднократна и повтаряща се експозиция. Липса на зависимост от дозата може да бъде признак за насищане на ензимите, включени в метаболизма на съединението, увеличение на AUC след повтаряща се експозиция в сравнение с еднократна експозиция може да бъде указание за инхибиция на метаболизма, а намаляването на AUC може да бъде указание за индукция на метаболизма [вж. също (11)].

**Масов баланс:** Отчитане на изпитвания химикал, въвеждан в системата и напускащ системата.

**Материален баланс:** Вж. „Масов баланс“.

**Механизъм (начин) на токсичност/механизъм (начин) на действие:** Механизмът на действие се отнася до специфични биохимични взаимодействия, посредством които изпитваният химикал произвежда своя ефект. Начинът на действие се отнася до по-общи пътища, водещи до токсичност на даден изпитван химикал.

**Метаболизъм:** Синоним е на „биотрансформация“.

**Метаболити:** Продукти на метаболизма или метаболитните процеси.

**Орална абсорбция:** Процентът от дозата от изпитвания химикал, абсорбиран от мястото на прилагане (т.е. стомашно-чревния тракт). Този особено важен параметър може да бъде използван, за да се разбере частта от приложението изпитван химикал, която достига до порталната вена и, впоследствие, до черния дроб.

**Коефициент на разпределение:** Също известен като коефициент на разделяне, представлява мярка за различната разтворимост на даден химикал в два разтворителя.

**Върхови равнища в кръвта (плазмата/серума):** Максимална (върхова) концентрация в кръвта (плазмата/серума) след прилагането (вж. също „ $C_{max}$ “).

**Устойчивост (биоустойчивост):** Дългосрочно наличие на даден химикал (в дадена биологична система), дължащо се на резистентност по отношение на разлагане/елиминиране.

**Информация от вътрешногрупова интерполация на структурно подобни химикали:** Информацията относно крайната точка за един или повече химикали се използва за прогнозиране на крайната точка за целевия химикал.

**Микроскопска автордиография на рецептори (или микроавтордиография на рецептори):** Тази техника може да се използва за изследване на взаимодействието на ксенобiotик със специфични участъци от тъкани или клетъчни популации, като например изследвания на свързването към рецептор или изследвания на специфичен начин на действие, които могат да изискват висока разделителна способност и висока чувствителност, което може да не е осъществимо с други техники, като например автордиография на цялото тяло.

**Път на прилагане (орален, интравенозен, дермален, инхалаторен и др.):** Отнася се до начините, чрез които химикалите се прилагат към тялото (напр. орално чрез сонда, орално чрез режим на хранене, дермално, чрез инхалация, интравенозно и др.).

**Насищане:** Състояние, при което стойностите на един или повече кинетични процеси (напр. абсорбция, метаболизъм или клирънс) са максимални (да се чете „наситен“).

**Чувствителност:** Способността на даден метод или инструмент при измерването да различи отговори, които са представителни за различни равнища на дадена променлива, представляваща интерес.

**Равнища на постигане на стационарно състояние в кръвта (плазмата):** Неравновесно състояние на отворена система, в която всички сили, действащи върху системата, са в еднаква степен неутрализирани от противодействащи сили, по такъв начин, че концентрацията на всички нейни компоненти е стационарна, въпреки че през системата преминава материя.

**Моделиране на системи:** (физиологично характеризирано токсикокинетично, фармакокинетично характеризирано, физиологично характеризирано фармакокинетично, биологично характеризирано и др.): Абстрактен модел, който използва математически език за описване на поведението на дадена система.

**Прицелна тъкан:** Тъкан, в която се проявява основен неблагоприятен ефект от даден токсикант.

**Изпитван химикал:** Всякакво вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

**Разпределение в тъканите:** Обратимо движение на изпитван химикал от едно място в тялото до друго. Разпределението в тъканите може да бъде изследвано чрез методи като дисекция на органи, хомогенизиране, изгаряне и течно-сцинтиляционно броене, или чрез качествена и/или количествена автордиография на цялото тяло. Първата група методи е полезна при получаване на дадена концентрация и процент на възстановяване от тъкани на животни и остатъчни трупове от същите животни, но може да ѝ липсва достатъчна разделителна способност за всички тъкани и може да има по-малко от идеалното цялостно възстановяване (< 90 %). Вж. по-горе определението за втората група методи.

**T<sub>max</sub>:** Време за достигане на C<sub>max</sub>.

**Токсикокинетика (Фармакокинетика):** Изследване на абсорбцията, разпределението, метаболизма и екскрецията на химикали във времето.

**Валидиране на модели:** Процес на оценяване на адекватността на даден модел да описва последователно достъпните токсикокинетични данни. Моделите могат да се оценяват чрез статистическо и визуално сравнение на изчислените чрез тях прогнозни стойности със стойностите от опити по отношение на обща независима променлива величина (напр. време). Обхватът на оценката следва да бъде обоснован във връзка с планираната употреба на модела.“

8) Добавя се следната глава Б.52:

## „Б.52. ОСТРА ИНХАЛАТОРНА ТОКСИЧНОСТ — МЕТОД КЛАС ОСТРА ТОКСИЧНОСТ

### УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 436 на ОИСП (ОИСП TG 436) (2009 г.). Първото TG 403 за остра инхалаторна токсичност е прието през 1981 г. и оттогава е преработено (вж. глава Б.2 от настоящото приложение (1)). Разработването на метод клас остра токсичност за остра инхалаторна токсичност (2) (3) (4) е било сметено за уместно след приемането на преработения метод клас остра токсичност за остра орална токсичност (глава Б.1 от настоящото приложение) (5). Ретроспективна оценка на резултатите от метод клас остра токсичност за изпитване на остра инхалаторна токсичност показва, че методът е подходящ за използване за целите на класифицирането и етикетирането (6). Методът при клас остра токсичност за изпитване на остра инхалаторна токсичност ще позволи използването на последователни стъпки от фиксирани целеви концентрации за степенуване на токсичността на изпитваните химикали. Смъртността се използва като ключова крайна точка, обаче животните, изпитващи силна болка или дистрес, страдание или неизбежна смърт, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин за да бъде сведено до минимум страданието. Насоки за хуманен край са дадени в Ръководството на ОИСП № 19 (7).
2. Указания за провеждането на и интерпретирането по настоящия метод за изпитване могат да бъдат намерени в Ръководство № 39 за изпитвания на остра инхалаторна токсичност (GD 39) (8).
3. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в допълнение 1 и в GD 39 (8).
4. Настоящият метод за изпитване осигурява информация за опасните свойства и позволява изпитваният химикал да бъде категоризиран и класифициран съгласно Регламент (ЕО) № 1272/2008 за класифициране на химикали, които причиняват остра токсичност (9). В случай че се изискват точкови оценки на стойности на LC<sub>50</sub> или анализи концентрация-отговор, подходящият метод за изпитване, който следва да се използва, е глава Б.2 от настоящото приложение (1). Допълнителни насоки за избор на метод за изпитване могат да бъдат намерени в GD 39 (8). Настоящият метод за изпитване не е специално предназначен за изпитването на специализирани материали, като малко разтворими изометрични или влакнести материали, или произведени наноматериали.

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

5. Преди обсъждането на изпитване в съответствие с настоящия метод за изпитване цялата налична информация за изпитвания химикал, включително съществуващите изследвания, чиито данни са в подкрепа да не се извършва допълнително изпитване, следва да бъдат разгледани от лабораторията, извършваща изпитвания, с цел да се сведе до минимум използването на животни. Информацията, която може да помогне при избора на най-подходящия вид, порода, пол, път на експозиция, и на подходящи концентрации за изпитване, включва идентификация на изпитвания химикал, неговата химична структура и физичните и химичните му свойства; резултатите от всякакви изпитвания за токсичност, извършени *in vitro* или *in vivo*; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност и токсикологични данни за химикали със сходна структура. Концентрации, за които се очаква, че могат да причинят силна болка или дистрес, поради корозивно<sup>(1)</sup> или силно дразнещо въздействие, не следва да бъдат изпитвани с настоящия метод за изпитване [вж. GD 39 (8)].

**ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО**

6. Принципът на изпитването е, че въз основа на поетапна процедура се получава достатъчна информация за острата инхалаторна токсичност на изпитвания химикал за период на експозиция от 4 часа, за да се даде възможност за неговото класифициране. Друга продължителност на експозицията може да се прилага за изпълнение на специфични регулаторни цели. Изпитват се по 3 животни от всеки пол, независимо на коя от определените стъпки на концентрацията. В зависимост от смъртността и/или терминалното състояние на животните 2 стъпки могат да бъдат достатъчни за оценка относно острата токсичност на изпитвания химикал. Ако са налице доказателства, че единият пол е по-възприемчив от другия, изпитването може да бъде продължено само с по-възприемчивия пол. Резултатите от предходната стъпка определят следващата стъпка така, че:
- а) не е необходимо по-нататъшно изпитване;
  - б) изпитване на три животни от пол; или
  - в) изпитване с 6 животни само от по-възприемчивия пол, т.е. очакванията за по-ниската граница в класа токсичност следва да се основават на 6 животни във всяка група за изпитване на определена концентрация, независимо от техния пол.
7. Умиращи животни или животни, очевидно изпитващи болка или показващи признаци на силен и продължителен дистрес, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин, като при интерпретирането на резултатите от изпитванията те се третираат по същия начин, както животните, умрели по време на изпитването. Критериите за вземане на решение за умъртвяване на умиращи или силно страдащи животни и указанията за разпознаване на предвидима или неизбежна смърт, са предмет на Ръководство № 19 за хуманен край (7).

**ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Избор на животински вид**

8. Следва да се използват здрави млади полово зрели животни от обичайно употребяваните за лабораторни изследвания породи. Предпочитаният вид е плъхът и трябва да се представи обосновка, ако са използвани други видове.

**Подготовка на животните**

9. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. Към деня на експозицията животните следва да са млади полово зрели индивиди на възраст от 8 до 12 седмици и с телесно тегло в рамките на  $\pm 20\%$  от средното тегло за всеки пол за всички по-рано експонирани животни от същата възраст. Животните се избират произволно и се маркират за индивидуална идентификация. Животните се държат в техните клетки най-малко 5 дни преди началото на изпитването, за да се даде възможност за аклиматизиране към лабораторните условия. Необходимо е също животните да се аклиматизират към изпитвателната апаратура за кратък период преди изпитването, тъй като това ще намали стреса, предизвикан от въвеждането в новата среда.

**Отглеждане на животните**

10. Температурата на помещението, в което се отглеждат опитните животни, следва да бъде  $22 \pm 3$  °C. В идеалния случай относителната влажност следва да бъде поддържана в интервала от 30—70 %, макар че поддържането в този интервал може да не е възможно, когато се използва вода като носител. Преди и след експозициите животните обичайно следва да се поставят в клетките в групи по пол и концентрация, но броят на животните в дадена клетка не следва да възпрепятства точните наблюдения над всяко животно и следва да свежда до минимум загубите поради канибализъм и борба. За животни, при които експозицията е само през носа, може да е необходимо същите да бъдат аклиматизирани към ограничителните тръби. Ограничителните тръби не следва да причиняват ненужен стрес у животните поради физични, термични или причини, свързани с обездвижване. Ограничаването може да засегне физиологични крайни точки като телесната температура (хипертермия) и/или минутния дихателен обем. Ако са налични типови данни, които показват, че не настъпват такива осезаеми промени, тогава не е необходимо предварително адаптиране към ограничителните тръби. Животни, при които експозицията на аерозол е на цялото тяло, следва да се настаняват отделно по време на експозицията, за да се предотврати възможността животното да филтрува изпитвателния аерозол през козината на намиращи се в същата

<sup>(1)</sup> Оценката на корозивността може да се основава на експертна оценка, като се използват доказателства като: човешки опит и опит с животни, съществуващи данни (*in vitro*), напр. глава Б.40 (10), В.40А (11) от настоящото приложение или ОИСП TG 435 (12), стойности на рН, информация за аналогични химикали или всякакви други подходящи данни.

клетка други животни. Освен по време на експозицията, могат да се използват конвенционални и сертифицирани лабораторни храни, придружени с неограничено количество битова питейна вода. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина/12 часа тъмнина.

#### **Инхалационни камери**

11. При избора на инхалационна камера следва да бъдат разгледани естеството на изпитвания химикал и целта на изпитването. Предпочитаният начин на експозиция е само през носа (в този термин се включват експозиции само на главата, само през носа или само през муцуната). Експозицията само през носа обичайно се предпочита при изследване на течни и твърди аерозоли, както и на пари, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. Специалните цели на изследването могат да се постигнат по-добре чрез използване на режим на експозиция на цялото тяло, но това следва да бъде обосновано в доклада от изследването. За да се гарантира стабилност на атмосферата при използване на камера за експозиция на цялото тяло, общият обем на изпитваните животни не трябва да надвишава 5 % от обема на камерата. Принципиите на техниките за експозиция само през носа и за експозиция на цялото тяло и техните специфични предимства и недостатъци са описани в GD 39 (8).

#### **УСЛОВИЯ НА ЕКСПОЗИЦИЯ**

##### **Прилагане на концентрациите**

12. Препоръчва се продължителност на експозицията, фиксирана на четири часа, с изключение на времето за уравновесяване. Различна продължителност може да е необходима за изпълнение на специфични изисквания, но следва да се даде обосновка в доклада от изследването [вж. GD 39 (8)]. Животните, експонирани в камери за цялото тяло, следва да се настъпят поотделно, за да се предотврати поглъщането на изпитвания химикал в резултат от поддържане на външния вид на други индивиди в същата клетка. По време на експозицията не трябва да се дава храна. Вода може да се дава по време на експозицията на цялото тяло.
13. Животните се експонират на изпитвания химикал, който представлява газ, пари, аерозол или смес от тях. Агрегатното състояние, което трябва да бъде изпитано, зависи от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, избраната концентрация, и/или най-вероятната физична форма по време на манипулирането и употребата на изпитвания химикал. Хигроскопични и химически реактивоспособни изпитвани химикали следва да бъдат изпитвани в среда от сух въздух. Следва да се полагат грижи за избягване достигането на концентрации, при които може да бъде причинена експлозия.

##### **Разпределение според размера на частиците**

14. Следва да бъде извършено определяне на размера на частиците за всички аерозоли и за парите, които могат да кондензират с образуване на аерозоли. За да могат да бъдат експонирани всички относими части на дихателните пътища се препоръчват аерозоли с диаметър, равен на аеродинамичния диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD), намиращ се в диапазон от 1 до 4  $\mu\text{m}$  и с геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ) в диапазон от 1,5 до 3,0 (8) (13) (14). Въпреки че следва да се положи разумно усилие за спазване на този стандарт, ако това не може да бъде постигнато следва да бъде предоставена експертна оценка. Например стойностите за метални пари могат да бъдат по-малки от този стандарт, а за заредени частици, влакна и хигроскопични материали (които увеличават размера си във влажната среда на дихателните пътища) могат да надхвърлят този стандарт.

##### **Подготовка на изпитвания химикал в носител**

15. За постигане на подходяща концентрация и размер на частиците на изпитвания химикал в атмосферата може да бъде използван носител. По правило следва да бъде предпочитана водата. Частиците от даден материал могат да бъдат подложени на механични процеси за да се постигне изискваното разпределение според размера на частиците, но трябва да се вземат мерки изпитваният химикал да не бъде разложен или променен. В случаите, когато се предполага, че механичните процеси са довели до изменение на състава на изпитвания химикал (например причинена от триене много висока температура в резултат от прекомерно смилане), съставът на изпитвания химикал следва да бъде проверен по аналитичен път. Следва да бъдат взети адекватни мерки да не се допусне замърсяване на изпитвания химикал. Не е необходимо да се изпитват неронливи гранулирани материали, които са целенасочено изготвени така, че да не могат да бъдат инхалирани. За да се докаже, че при манипулирането на гранулирания материал не се произвеждат частици, които могат да бъдат вдишвани, следва да се приложи изпитване чрез триене. Ако при изпитване чрез триене бъдат произведени частици, които могат да бъдат вдишвани, следва да се извърши изпитване за инхалаторна токсичност.

##### **Контролни животни**

16. Паралелна отрицателна контролна група (въздух) не е необходима. Когато за подпомагане генерирането на атмосферата за изпитване се използва носител, различен от вода, контролна група за носителя следва да се използва само в случай че не са достъпни данни за инхалаторна токсичност за минали периоди. Ако при дадено изследване за токсичност на изпитван химикал в състав с носител не бъде установена токсичност, от това следва, че носителът не е токсичен при концентрацията на изпитване; следователно не е необходима контрола за носителя.

#### **МОНИТОРИНГ НА УСЛОВИЯТА НА ЕКСПОЗИЦИЯ**

##### **Въздушен поток в камерата**

17. Въздушният поток през камерата трябва да бъде внимателно контролиран, непрекъснато наблюдаван и записван най-малко на всеки час по време на всяка експозиция. Мониторингът на концентрацията (или стабилността) на атмосферата за изпитване представлява цялостно измерване на всички динамични параметри и предоставя непряко

средство за контрол на всички относими динамични параметри, свързани с генериране на атмосфера. Специално внимание следва да се обърне на избягване, при камери за експозиция само през носа, на повторно инхалиране в случаи, при които системата за експозиция не може да осигури адекватна динамика на потока на атмосферата с изпитвания химикал. Съществуват предписани методологии, които могат да се използват за доказване, че в рамките на избраните работни условия не настъпва повторно инхалиране (8) (15). Концентрацията на кислород следва да бъде не по-малко от 19 %, а концентрацията на въглероден диоксид не трябва да превишава 1 %. Ако има основание да се смята, че тези стандарти не могат да бъдат спазени, концентрациите на кислорода и на въглеродния диоксид следва да се измерват.

#### Температура и относителна влажност на камерата

18. Температурата в камерата трябва да се поддържа на  $22 \pm 3$  °C. Относителната влажност в зоната на дишане на животните — както за експозиция само през носа, така и за експозиция на цялото тяло — трябва да бъде наблюдавана и записвана най-малко три пъти за продължителности до 4 часа и на всеки час за по-кратки продължителности. В идеалния случай относителната влажност трябва да бъде поддържана в диапазона между 30 и 70 %, но това може или да се окаже непостижимо (например при изпитване на смеси на основата на вода), или да не може да бъде измерено поради въздействие на изпитвания химикал върху метода за изпитване.

#### Изпитван химикал: номинална концентрация

19. Когато е осъществимо, номиналната концентрация в камерата за експозиция следва да се изчислява и записва. Номиналната концентрация е масата на генерирания изпитван химикал, разделена на общия обем въздух, преминал през камерната система. Номиналната концентрация не се използва за характеризиране на експозицията на животните, а сравнение на номиналната концентрация и действителната концентрация дава показание за ефикасността на генериране на системата за изпитване и следователно може да се използва за откриване на проблеми при генерирането.

#### Изпитван химикал: действителна концентрация

20. Действителната концентрация е концентрацията на изпитвания химикал в зоната на дишане на животните в дадена инхалационна камера. Действителни концентрации могат да бъдат получени чрез специфични методи (например чрез пряко пробовземане, свързани с адсорбция или с химична реакция методи и последващо аналитично охарактеризиране) или чрез неспецифични методи, като гравиметричен анализ с филтруване. Използването на гравиметричен анализ е приемливо само за еднокомпонентни прахови аерозоли или за аерозоли от ниско летливи течности и следва да бъде подпомогнато от подходящо специфично за изпитвания химикал охарактеризиране чрез предварително изследване. Концентрацията на многокомпонентни прахови аерозоли също може да бъде определяна чрез гравиметричен анализ. Това обаче изисква аналитични данни, които доказват, че съставът на намиращия се във въздуха материал е подобен на този на изходния материал. Ако тази информация не е налична, може да е необходимо извършване на анализ на изпитвания химикал (в идеалния случай в състоянието, в което е разтворен във въздуха), повтарящо се на редовни интервали по време на изследването. За агенти в аерозолна форма, които могат да се изпаряват или да сублимират, следва да се покаже, че всички фази са събрани по избрания метод. Целевата, номиналната и действителната концентрации следва да бъдат посочени в доклада от изследването, но в статистически анализи за изчисляване на стойностите на леталната концентрация се използват само действителните концентрации.
21. По възможност следва да се използва една партида от изпитвания химикал, като изпитваната проба следва да се съхранява при условия, при които се поддържат нейната чистота, хомогенност и устойчивост. Преди началото на изследването следва да се направи охарактеризиране на изпитвания химикал, включително неговата чистота и, ако е технически осъществимо, идентичността, както и количествата на определените замърсители и примеси. Това може да бъде доказано от, но не се ограничава до, следните данни: времето на задръжане и относителната площ на пика, молекулната маса от анализи чрез масспектрометрия или газова хроматография, или други оценки. Въпреки че лабораторията, извършваща изпитвания, не носи отговорност за идентифицирането на пробата за изпитване, може да е разумно лабораторията, извършваща изпитвания, да потвърди охарактеризирането на финансиращия, дори и в ограничена степен (например цвят, физична природа и др.).
22. Атмосферата на експозицията трябва да бъде поддържана постоянна, доколкото е практически възможно, и да бъде наблюдавана непрекъснато и/или периодически в зависимост от метода за анализ. Когато се прилага периодически пробовземане, пробите от атмосферата в камерата трябва да се вземат най-малко два пъти при четиричасово изследване. Ако това е практически неосъществимо поради ограничена скорост на въздушния поток или ниска концентрация, през целия период на експозиция може да бъде извършено само едно пробовземане. Ако се получат значителни колебания в стойностите между отделните проби, следващите концентрации следва да бъдат изпитвани с четири пробовземания на експозиция. Индивидуалните проби от концентрацията в камерата не трябва да се отклоняват от средната концентрация в камерата с повече от  $\pm 10$  % за газовете и парите или не повече от  $\pm 20$  % за течните или твърдите аерозоли. Времето за уравнивяване на камерата ( $t_{95}$ ) следва да се изчислява и записва. Продължителността на дадена експозиция обхваща времето, за което се генерира изпитваният химикал, като при това се взема предвид изискваният период за постигане на  $t_{95}$ . Указания за оценката на  $t_{95}$  могат да бъдат намерени в GD 39 (8).
23. При много сложни смеси, съставени от пари/газове и аерозоли (например атмосфера след горене и изпитвани химикали, отделяни от целеви продукти/оборудване за крайна употреба), всяка фаза може да реагира по различен начин в инхалационната камера и следователно от всяка фаза (пари/газ и аерозол) следва да бъде избрано най-малко едно вещество (аналит), служещо като показател, като обичайно това е основното активно вещество в сместа. Когато изпитваният химикал е смес, аналитичната концентрация следва да се докладва за цялата смес, а не само за активната съставка или за компонента (аналита). Допълнителна информация относно действителните концентрации може да бъде намерена в GD 39 (8).

**Изпитван химикал: разпределение по размери на частиците**

24. Разпределението според размера на частиците на аерозоли трябва да се определи най-малко два пъти по време на всяка 4-часова експозиция, като се използва каскаден импактор или алтернативен инструмент, като например спектрометър за определяне на размера на аеродинамични частици. Ако може да бъде доказана равностойността на резултатите, получени от каскадния импактор и от алтернативния инструмент, тогава алтернативният инструмент може да бъде използван по време на цялото изследване. Успоредно с основния инструмент следва да бъде използвано второ устройство, като например гравиметричен филтър или поглътител с възвещавача тръбичка (импинджер)/барботиращ апарат, за да се потвърди ефикасността на пробовземането на основния инструмент. Масовата концентрация, получена чрез анализ на размера на частиците, следва да бъде в рамките на разумни граници от масовата концентрация, получена чрез филтруване [вж. GD 39 (8)]. В случай че тяхната равностойност може да бъде доказана в ранния етап на изследването, могат да не се извършват допълнителни измервания за потвърждение. От съображения за хуманно отношение към животните следва да се вземат мерки за свеждане до минимум на недостатъчните за формулиране на заключение данни, които могат да доведат до необходимост от повтаряне на дадена експозиция. Определяне на размера на частиците трябва да бъде направено за пари, ако съществува вероятност кондензация на парите да доведе до образуване на аерозол, или ако бъдат открити частици в атмосфера от пари с потенциал за смесени фази (вж. точка 14).

**ПРОЦЕДУРА****Основно изпитване**

25. За всяка стъпка се използват по три животни от пол, или шест животни от по-възприемчивия пол. Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Равнището на концентрация, което се използва като начална доза, се избира от едно от четири фиксирани равнища и равнището на началната концентрация следва да бъде това, при което с най-голяма вероятност се постига токсичност в някои от животните, на които се прилага дозата. Схемите за изпитване за газове, пари и аерозоли (включени в допълнения 2—4) представляват изпитване с граничните стойности на категории 1—4 от регламента относно класифицирането, етикетването и опаковането (9) за газове (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (допълнение 2), за пари (0,5, 2, 10, 20 mg/L/4 часа) (допълнение 3) и за аерозоли (0,05, 0,5, 1, 5 mg/L/4 часа) (допълнение 4). Категория 5, която не се прилага в Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9), се отнася до концентрации над съответните гранични концентрации. За всяка начална концентрация се прилага съответната схема за изпитване. В зависимост от броя на умъртвените по хуманен начин или умрели животни процедурата за изпитване следва посочените стрелки, докато може да бъде направено категоризиране.
26. Времевият интервал между групите за експозиция се определя от първоначалното появяване на токсичните признаци и от тяхната продължителност и сила. Експонирането на животните на следващото равнище на концентрация следва да бъде забавено, докато се получи достатъчна увереност за преживяемост на изпитваните преди това животни. Препоръчва се да има период от три или четири дни между експозициите на всяко равнище на концентрация, за да се даде възможност за наблюдения за забавена токсичност. При необходимост времевият интервал може да бъде регулиран, напр. в случай на отговори, от които не може да се направи заключение.

**Изпитване при пределна концентрация**

27. Изпитване при пределна концентрация се използва, когато се знае или се очаква изпитваният химикал да бъде практически нетоксичен, т.е. предизвикващ токсичен отговор само над нормативно определената пределна концентрация. Информация за токсичността на изпитвания химикал може да бъде получена от познания за подобни изпитани вещества или смеси, като се вземат предвид идентичността и процентното съдържание на компонентите, за които е известно, че са с токсикологично значение. В случаите, когато има малко или няма информация за токсичността на изпитвания химикал, или при които се очаква изпитваният химикал да бъде токсичен, следва да се проведе основното изпитване [по-нататъшни насоки могат да бъдат намерени в GD 39 (8)].
28. Като се използва нормалната процедура, три животни от пол, или шест животни от по-възприемчивия пол се експонират на концентрации от 20 000 ppm за газове, 20 mg/l за пари и 5 mg/l за прах/мъгла съответно (ако е постижимо), като това служи за изпитване при пределна концентрация за настоящия метод за изпитване. При изпитване на аерозоли основната цел следва да бъде постигането на размер на частиците, позволяващ вдишването им (т.е. MMAD от 1—4 µm). Това е възможно за повечето изпитвани химикали при концентрация от 2 mg/l. Изпитване на аерозоли при концентрация, по-висока от 2 mg/l, следва да се извършва само ако може да бъде постигнат размер на частиците, позволяващ вдишването им [вж. GD 39 (8)]. В съответствие с Глобалната хармонизирана система (16), изпитването с превишение на пределната концентрация не се насърчава от съображения за хуманно отношение към животните. Изпитване в категория 5 от Глобалната хармонизирана система (16), която не се прилага по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9), следва да се има предвид само когато съществува голяма вероятност резултатите от такова изпитване да имат пряка относимост за опазване здравето на хората, и следва да се представи обосновка в доклада от изследването. В случай на потенциално взривоопасни изпитвани химикали следва да се положат усилия за избягване на условия, предразполагащи експлозия. С оглед избягване на ненужно използване на изпитвани животни следва да се извърши изпитване без животни преди изпитването при пределна концентрация, за да се гарантира, че в камерата могат да бъдат постигнати условията за изпитването при пределна концентрация.

**НАБЛЮДЕНИЯ**

29. Върху животните трябва да бъдат извършвани чести клинични наблюдения по време на периода на експозиция. След експозицията клинични наблюдения следва да бъдат извършвани най-малко два пъти в деня на експозиция, или по-често, ако има показания от отговора на животните на третирането, и най-малко един път дневно след това общо в продължение на 14 дни. Продължителността на периода на наблюдение не е фиксирана, но следва да се определя от характера и времето на поява на клиничните признаци и от продължителността на възстановителния период. Моментите във времето, в които признаците на токсичност се появяват и изчезват, са важни, особено ако съществува тенденция към забавяне появата на признаците на токсичност. Всички наблюдения

систематично се записват с индивидуални архиви, които се поддържат за всяко животно. Животните, намерени в терминално състояние, и животните, показващи признаци на силна болка и/или продължителни признаци на силен дистрес, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин по причини, свързани с хуманното отношение към животните. При провеждането на изпитвания за клинични признаци на токсичност трябва да се внимава първоначално трудно забележимите и преходните респираторни промени в резултат от процедурата по експозицията да не бъдат взети погрешно за ефекти, свързани с третирането. Следва да бъдат взети предвид принципите и критериите, резюмирани в Ръководството за хуманен край (7). Когато животните са умъртвени по хуманни причини или са намерени мъртви, времето на смъртта им следва да бъде записано колкото е възможно по-точно.

30. Наблюденията в клетките следва да включват изменения в кожата и козината, очите и лигавиците, също и в дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, както и в соматомоторната активност и поведението на животните. Всякакво разграничение между локални и системни ефекти трябва да бъде отбелязвано, когато е възможно. Вниманието следва да бъде насочено към наблюдения на треперене, конвулсии, слюноотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Измерването на ректалната температура може да предостави подкрепящи доказателства за рефлекторно забавено дишане или хипотермия/хипертермия, свързани с третирането или затвореното пространство.

#### Телесно тегло

31. Индивидуалното тегло на животните следва да бъде записвано веднъж през периода на аклиматизация, в деня на експозицията преди експозиция (ден 0), и най-малко през дни 1, 3 и 7 (и след това един път седмично), и към момента на настъпване на смъртта или евтаназията, ако е след ден 1. Телесното тегло е признато като изключително важен показател за токсичност и следователно животни, проявяващи устойчиво снижаване с  $> 20\%$  в сравнение със стойностите от предварителното изследване, трябва да бъдат стриктно наблюдавани. В края на периода след експозицията преживелите животни се претеглят и след това се умъртвяват по хуманен начин.

#### Патология

32. Всички изпитвани животни, включително умрелите по време на изпитването или подложените на евтаназия и извадени от изследването поради причини, свързани с хуманното отношение към животните, следва да бъдат подложени на макроскопска аутопсия. Ако аутопсията не може да се извърши веднага след откриването на мъртвото животно, трупът на животното трябва да бъде охладен (но не замразен) при температури, достатъчно ниски за да бъде сведена до минимум аутолизата. Аутопсията следва да се извърши във възможно най-кратък срок, обичайно в рамките на един или два дни. Следва да бъдат записани всички макроскопски патологични изменения за всяко животно, като се обърне особено внимание на всякакви изменения в дихателните пътища.
33. С оглед увеличаване на стойността за интерпретиране на изследването могат да бъдат разглеждани допълнителни изследвания, включени *a priori* по план, като например измерване на теглото на белите дробове на преживелите плъхове и/или осигуряване, чрез микроскопско изследване на дихателните пътища, на доказателства за дразнене. Изследваните органи могат да включват и тези, които представят доказателство за макроскопска патология при животните, преживели 24 часа или повече, както и органите, за които е известно или се очаква да бъдат засегнати. Микроскопското изследване на целия респираторен тракт може да предостави полезна информация за изпитвани химикали, които реагират с вода, такива като киселини и хигроскопични изпитвани химикали.

#### ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

##### Данни

34. Следва да бъдат посочени индивидуални данни за животните относно тяхното телесно тегло и находките при аутопсията. Данните от клиничните наблюдения следва да бъдат обобщени в таблична форма, показваща за всяка от изпитваните групи броя на използваните животни, броя на животните, проявяващи специфични признаци за токсичност, броя на животните, намерени мъртви по време на изпитването или умъртвени по хуманни причини, времето на настъпване на смъртта на отделните животни, описание и изменение във времето на токсичните ефекти и обратимостта им, както и находките при аутопсията.

##### Доклад от изпитването

35. Докладът от изпитването по целесъобразност следва да включва следната информация:

##### Изпитвани животни и отглеждане

- описание на условията в клетките, включително: брой (или промяна в броя) на животните в една клетка, материал за постилане, температура и относителна влажност на околната среда, продължителност на излагане на светлина и идентифициране на хранителния режим,
- използван вид/порода и обосновка за използване за видове, различни от плъх,
- брой, възраст и пол на животните,
- метод на случаен подбор,
- подробна информация за качеството на храната и водата (включително тип на хранителния режим/източник, водоизточник),
- описание на всякакво кондициониране преди изпитването, включително хранителен режим, карантина и лечение на заболявания.

*Изпитван химикал*

- физична природа, чистота и, където е относимо, физични и химични свойства (включително изомеризация),
- идентификационни данни и номер съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси (CAS), ако са известни;

*Носител*

- обосновка за използването на носител и обосновка за избора на носителя (ако е различен от вода),
- данни за минали периоди или паралелни данни, доказващи че носителят не пречи на резултата от изследването;

*Инхалационна камера*

- описание на инхалационната камера, включително размери и обем,
- източник и описание на оборудването, използвано за експозицията на животните, както и за генерирането на атмосферата,
- оборудване за измерване на температурата, относителната влажност, размера на частиците и действителната концентрация,
- източник на въздух, обработка на доставяния/извличания въздух и система, използвана за кондициониране,
- използвани методи за калибриране на оборудването за гарантиране на хомогенна атмосфера за изпитване,
- разлика в налягането (положителна или отрицателна),
- отвори за експозиция за всяка камера (експозиция само през носа); местоположение на животните в системата (експозиция на цялото тяло),
- хомогенност/устойчивост във времето на атмосферата за изпитване,
- разположение на датчиците за температура и относителна влажност и пробовземане на атмосферата за изпитване в камерата,
- скорости на въздушния поток, скорост на въздушния поток при отвор за експозиция (експозиция само през носа) или брой животни на камера (експозиция на цялото тяло),
- информация за оборудването, използвано за измерване на кислород и въглероден диоксид, ако е приложимо,
- време, необходимо за достигане на уравновесяване на инхалационната камера ( $t_{95}$ ),
- брой изменения на обема на час,
- измервателни прибори (ако е приложимо);

*Данни за експозицията*

- обосновка за избора на целева концентрация в основното изследване,
- номинални концентрации (обща маса на изпитвания химикал, генерирана в инхалационната камера, разделена на преминалия през камерата обем въздух),
- действителни концентрации на изпитвания химикал, взети от зоната на дишане на животните; за изпитвани смеси, които произвеждат хетерогенни физични форми (газове, пари, аерозоли), всяка от тези форми може да бъде анализирана отделно,
- всички концентрации във въздуха следва да бъдат докладвани в единици за масова концентрация ( $\text{mg/l}$ ,  $\text{mg/m}^3$  и т.н.), единици за отношение на обем (напр. ppb, ppb) могат също да бъдат докладвани в скоби,
- разпределение на частиците по размер, аеродинамичен диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD) и геометрично стандартно отклонение ( $\sigma_g$ ), включително методите за изчисляването им. Отделните анализи на размерите на частиците следва да бъдат докладвани;



*Условия на изпитването*

- подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал, включително подробна информация за всякакви процедури, използвани за намаляване на размера на частиците на твърди вещества или за приготвяне на разтвори на изпитвания химикал. В случаите, когато механични процеси може да са променили състава на изпитван химикал, се включват резултатите от анализите за проверка на състава на изпитвания химикал,
- описание (за предпочитане включващо схема) на оборудването, използвано за генериране на атмосферата за изпитване и за експозиция на животните на атмосферата за изпитване,
- подробни данни за използвания метод за анализ на химикала и за валидирането на метода (включително и ефикасността на добива на изпитвания химикал от матрицата на пробата),
- обосновката за избора на концентрациите за изпитване;

*Резултати*

- таблично представяне на данните за температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата,
- таблично представяне на данните за номиналната и действителната концентрация в камерата,
- таблично представяне на данните за размера на частиците, включително аналитични данни за пробовземането, за разпределението на частиците по размери, и изчисления на MMAD и  $\sigma_g$ ,
- таблично представяне на данните за отговора и на равнището на концентрация за всяко животно (т.е. животно, показващо признаци на токсичност, включително смъртност, природа, сила и продължителност на ефектите),
- индивидуалните телесни тегла на животните, измерени на съответните дни от изследването, дата и време на смъртта, ако е преди деня, за който е планирано умъртвяването; развитие във времето от първоначалното появяване на признаци за токсичност и дали са били обратими за всяко животно,
- находки от аутопсията и хистопатологични находки за всяко животно, ако има такива,
- класифицирането в категория от регламента относно класифицирането, етикетирането и опаковането, и граничната стойност на LC<sub>50</sub>;

*Дискусия и интерпретиране на резултатите*

- особено внимание следва да се обърне на описанието на методите, използвани за съответствие с критериите на настоящия метод за изпитване, например пределната концентрация, или размера на частиците,
- в контекста на цялостните констатации следва да бъде разгледан въпросът дали частиците могат да бъдат вдишвани, особено ако не е било възможно спазването на критериите за размер на частиците,
- съгласуваността на методите, използвани за определяне на номиналните и действителните концентрации, както и отношението на действителната концентрация към номиналната концентрация, трябва да бъдат включени в общата оценка на изследването,
- следва да бъдат разгледани вероятната причина за смъртта и преобладаващият начин на действие (системно срещу локално),
- трябва да се даде обосновка, ако е имало необходимост от умъртвяване по хуманен начин на животни, изпитващи болка или показващи признаци на силен и продължителен дистрес, въз основа на критериите в Ръководството на ОИСП за хуманен край (7).

**ПРЕПРАТКИ:**

- (1) Глава Б.2 от настоящото приложение („Остра токсичност (инхалаторна“).
- (2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.
- (3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

- (4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC<sub>50</sub> Tests. *ALTEX* 1: 129-134.
  - (5) Глава Б.1 от настоящото приложение („Остра орална токсичност — метод клас остра токсичност“).
  - (6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 105, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
  - (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
  - (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 39, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
  - (9) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 година относно класифицирането, етикетането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006 (ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1).
  - (10) Глава Б.40 от настоящото приложение („In vitro кожна корозия: транскутанно измерване на електрическото съпротивление на кожата (TER)“).
  - (11) Глава Б.40А от настоящото приложение („In vitro кожна корозия: изпитване върху модел на човешка кожа“)
  - (12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals № 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
  - (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2<sup>nd</sup> Edition) Informa Healthcare, New York.
  - (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.
  - (15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167
  - (16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_welcome\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html)]
-

*Допълнение 1*

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Изпитван химикал:** всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

---

## Допълнение 2

**Процедура, която трябва да бъде следвана за всяка от началните концентрации за газове (PPM/4H)**Общи бележки <sup>(1)</sup>

За всяка начална концентрация в това допълнение са включени съответните схеми за изпитване, които очертават процедурата, която трябва да бъде следвана.

Допълнение 2а: Началната концентрация е 100 ppm

Допълнение 2б: Началната концентрация е 500 ppm

Допълнение 2в: Началната концентрация е 2 500 ppm

Допълнение 2г: Началната концентрация е 20 000 ppm

В зависимост от броя на умъртвените по хуманен начин или умрели животни процедурата за изпитване следва посочените стрелки.

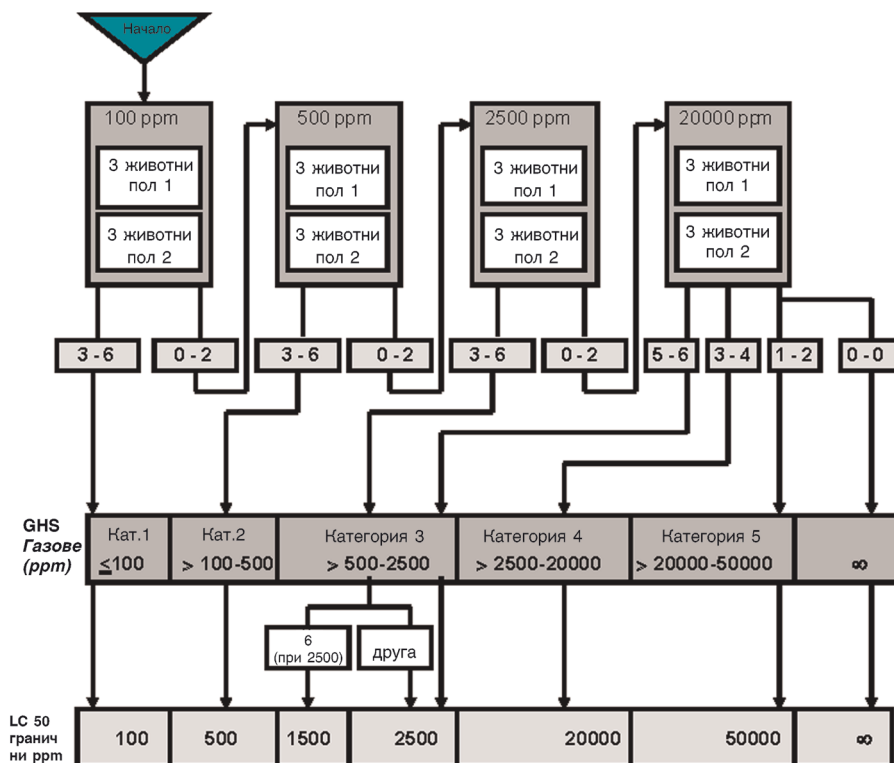
---

<sup>(1)</sup> В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламент (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

Допълнение 2а

Остра инхалаторна токсичност:

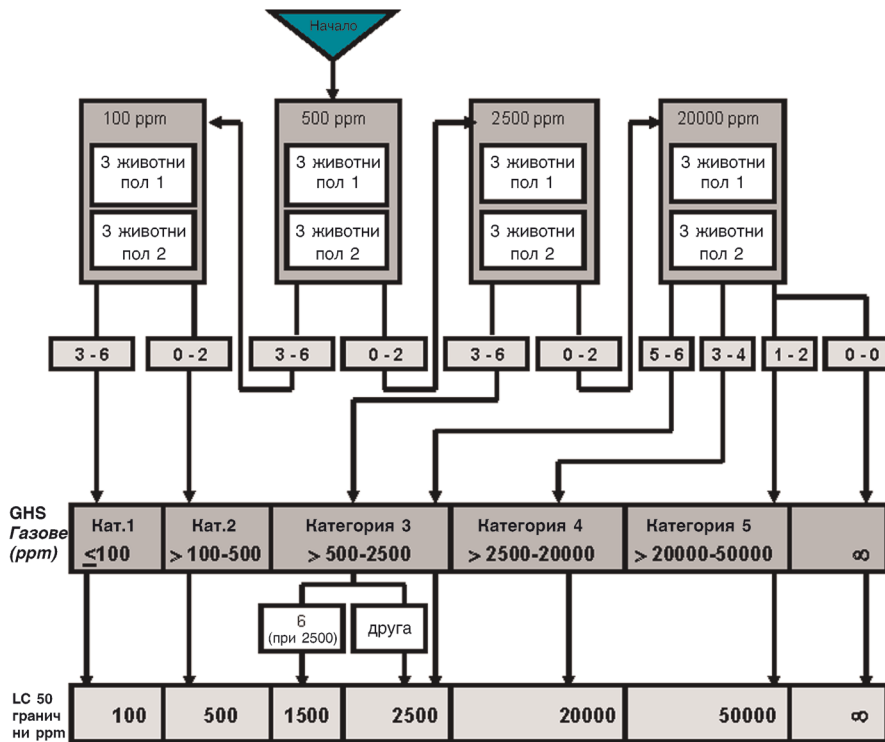
Процедура на изпитване с начална концентрация от 100 ppm/4 h за газове



- Използват се 3 σ + 3 φ, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

Допълнение 2б

**Остра инхалаторна токсичност:**  
**Процедура на изпитване с начална концентрация от 500 ppm/4 h за газове**

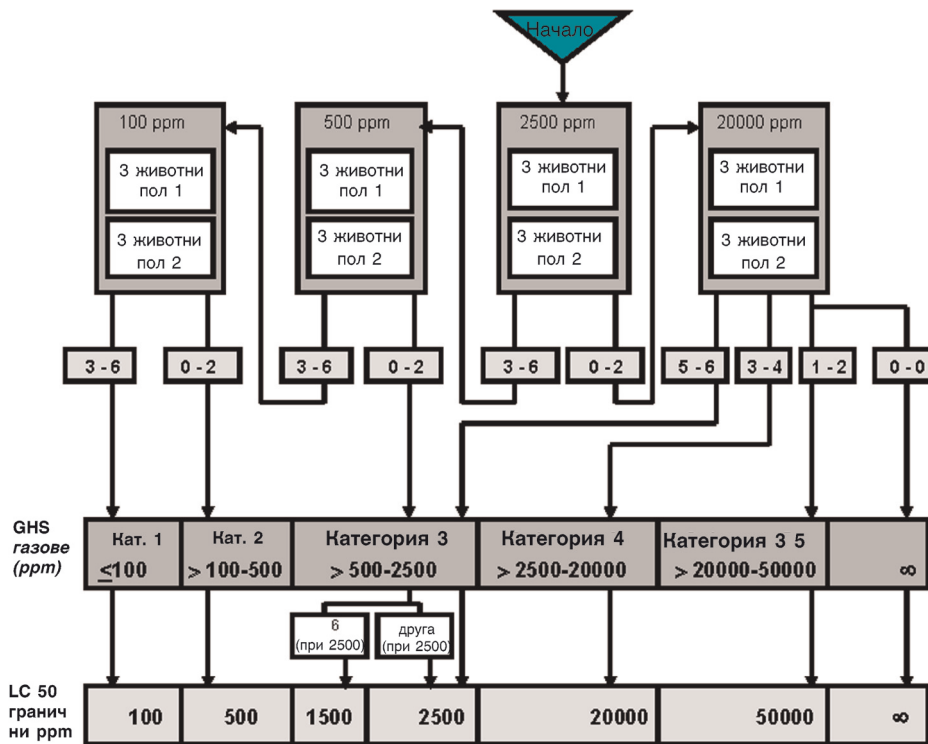


- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

Допълнение 2в

Остра инхалаторна токсичност:

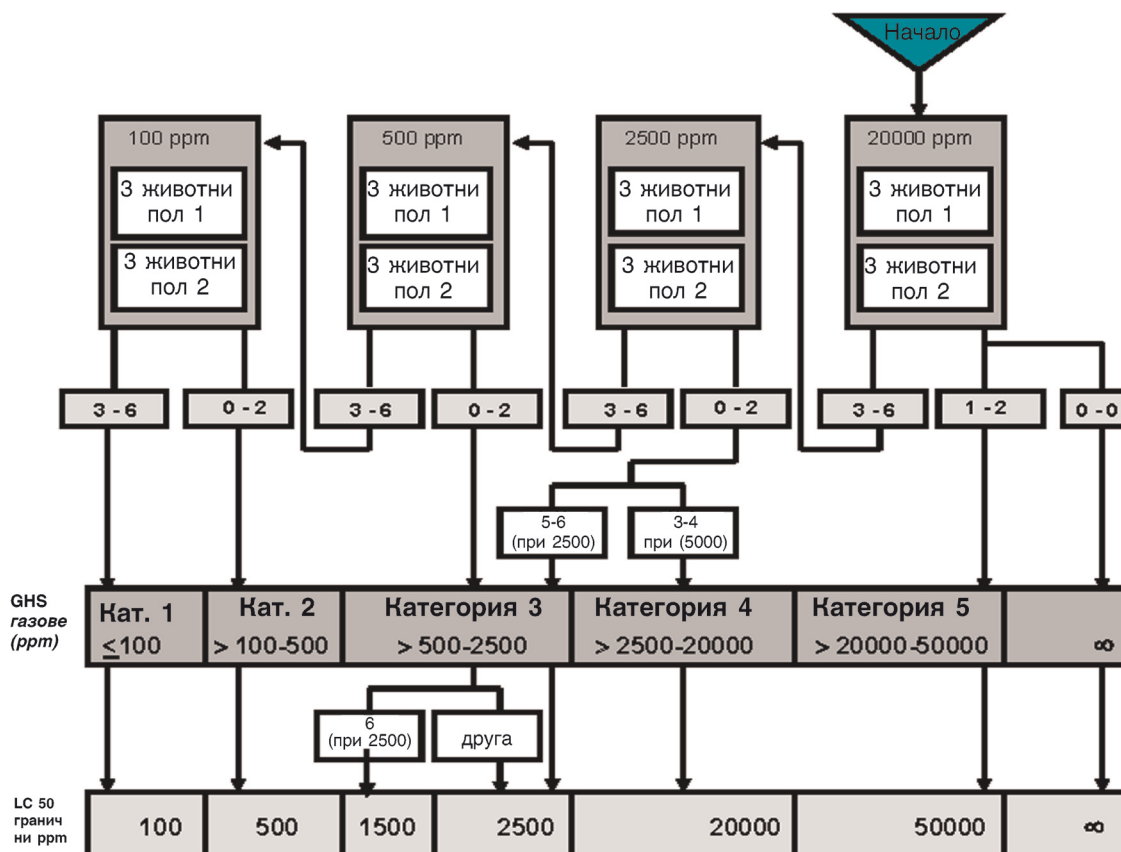
Процедура на изпитване с начална концентрация от 2 500 ppm/4 h за газове



- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

## Допълнение 2г

Остра инхалаторна токсичност:  
Процедура на изпитване с начална концентрация от 20 000 ppm/4 h за газове



- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умираци или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)



## Допълнение 3

**Процедура, която трябва да бъде следвана за всяка от началните концентрации за пари (MG/L/4H)**Общи бележки <sup>(1)</sup>

За всяка начална концентрация в това допълнение са включени съответните схеми за изпитване, които очертават процедурата, която трябва да бъде следвана.

Допълнение 3а: Началната концентрация е 0,5 mg/l

Допълнение 3б: Началната концентрация е 2,0 mg/l

Допълнение 3в: Началната концентрация е 10 mg/l

Допълнение 3г: Началната концентрация е 20 mg/l

В зависимост от броя на умъртвените по хуманен начин или умрели животни процедурата за изпитване следва посочените стрелки.

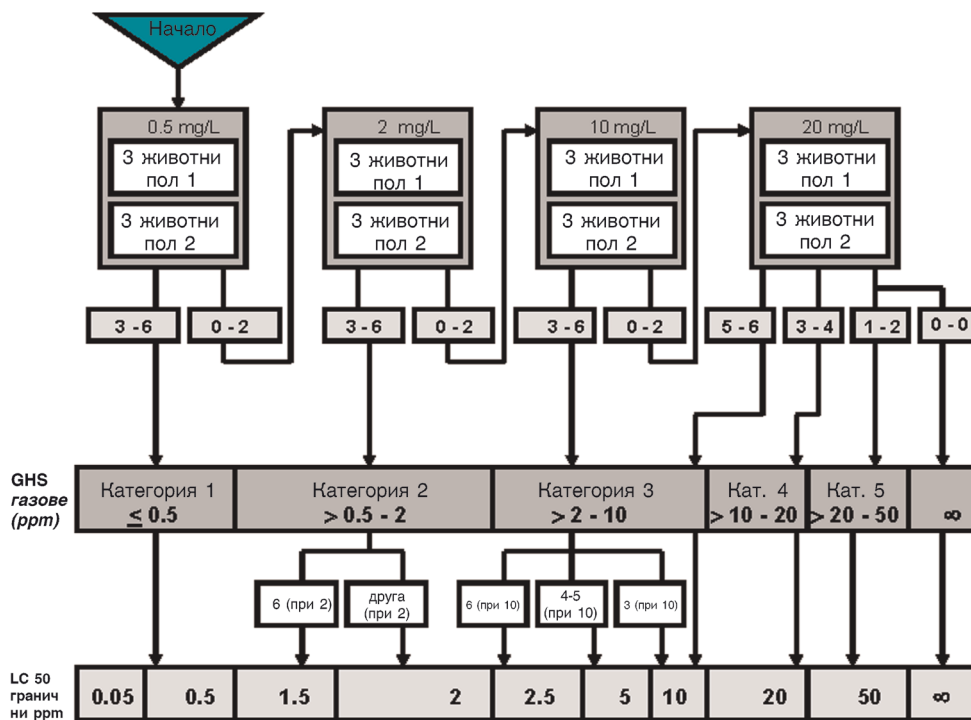
---

<sup>(1)</sup> В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламен (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

Допълнение За

Остра инхалаторна токсичност:

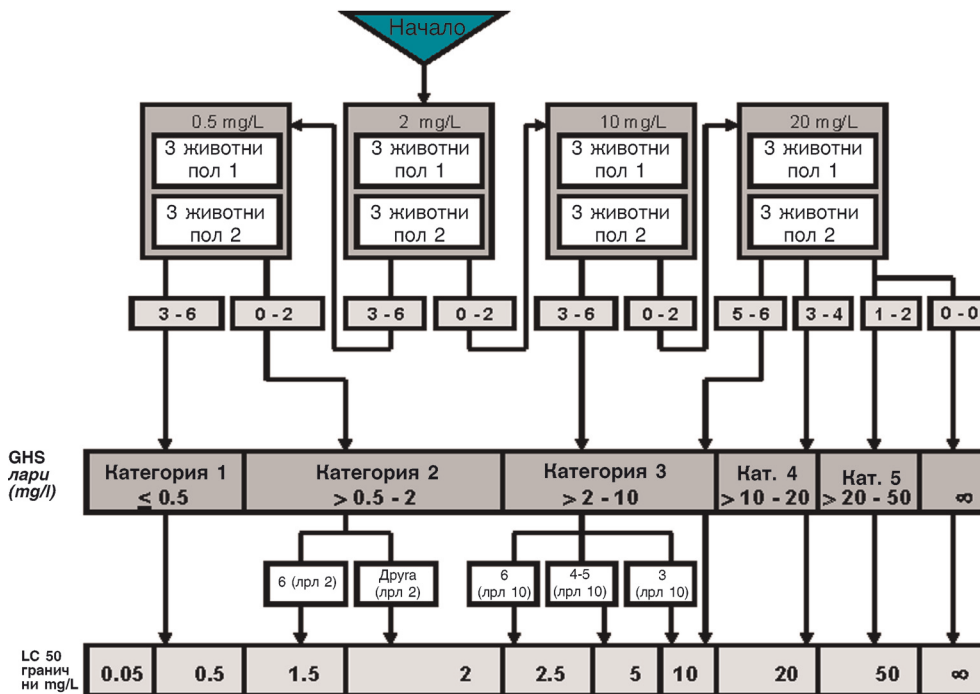
Процедура на изпитване с начална концентрация от 0,5 mg/L/4h за пари



- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

Допълнение 3б

**Остра инхалаторна токсичност**  
**Процедура на изпитване с начална концентрация от 2 mg/L/4h за пари**

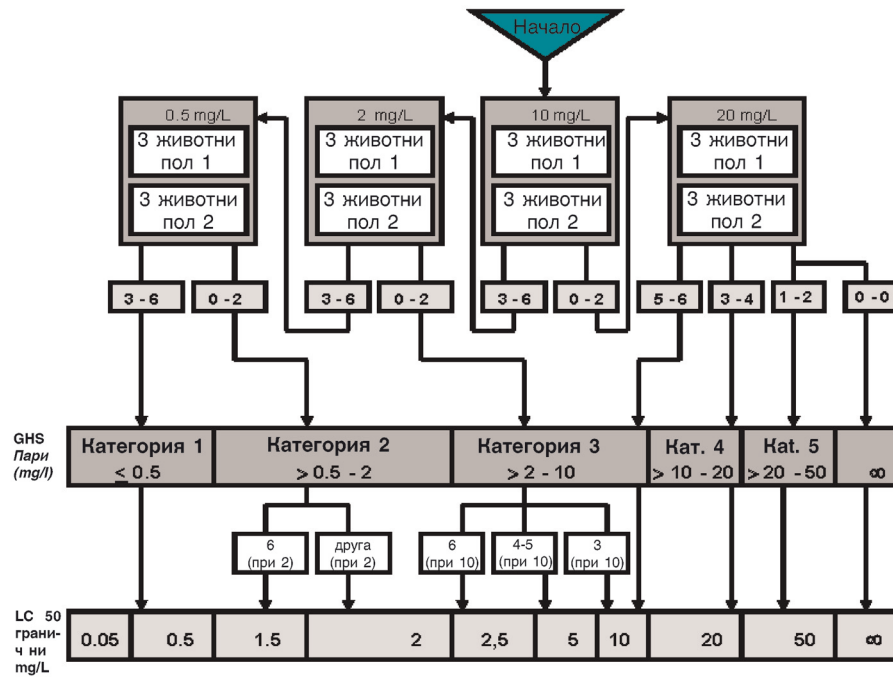


- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклаифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

## Допълнение 3в

## Остра инхалаторна токсичност

Процедура на изпитване с начална концентрация от 10 mg/L/4h за пари

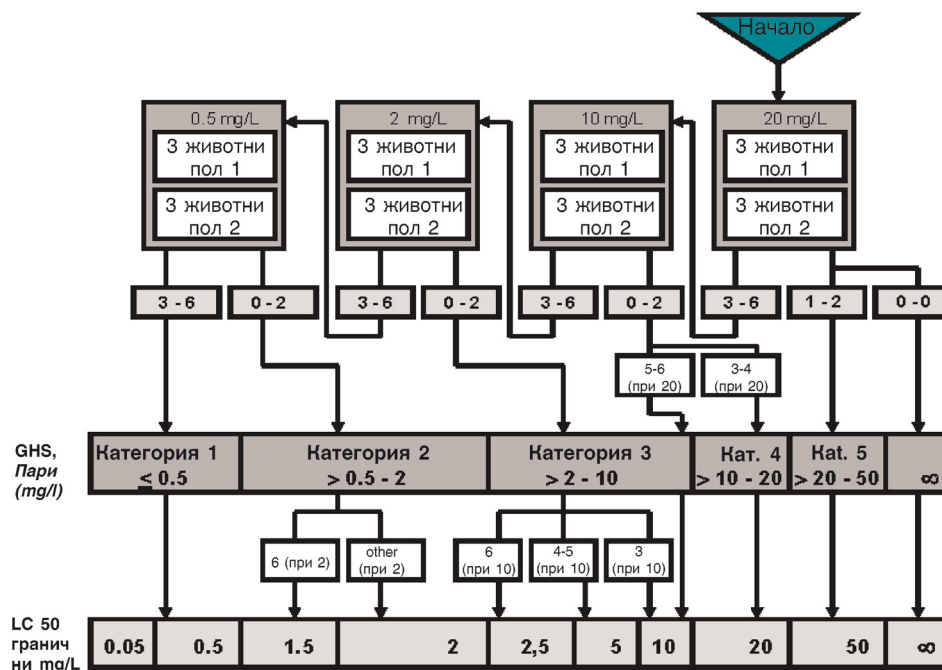


- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

Допълнение 3г

Остра инхалаторна токсичност

Процедура на изпитване с начална концентрация от 20 mg/L/4h за пари



- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

## Допълнение 4

**Процедура, която трябва да бъде следвана за всяка от началните концентрации за аерозоли (mg/l/4h)**Общи бележки <sup>(1)</sup>

За всяка начална концентрация в това допълнение са включени съответните схеми за изпитване, които очертават процедурата, която трябва да бъде следвана.

Допълнение 4а: Началната концентрация е 0,05 mg/l

Допълнение 4б: Началната концентрация е 0,5 mg/l

Допълнение 4в: Началната концентрация е 1 mg/l

Допълнение 4г: Началната концентрация е 5 mg/l

В зависимост от броя на умъртвените по хуманен начин или умрели животни процедурата за изпитване следва посочените стрелки.

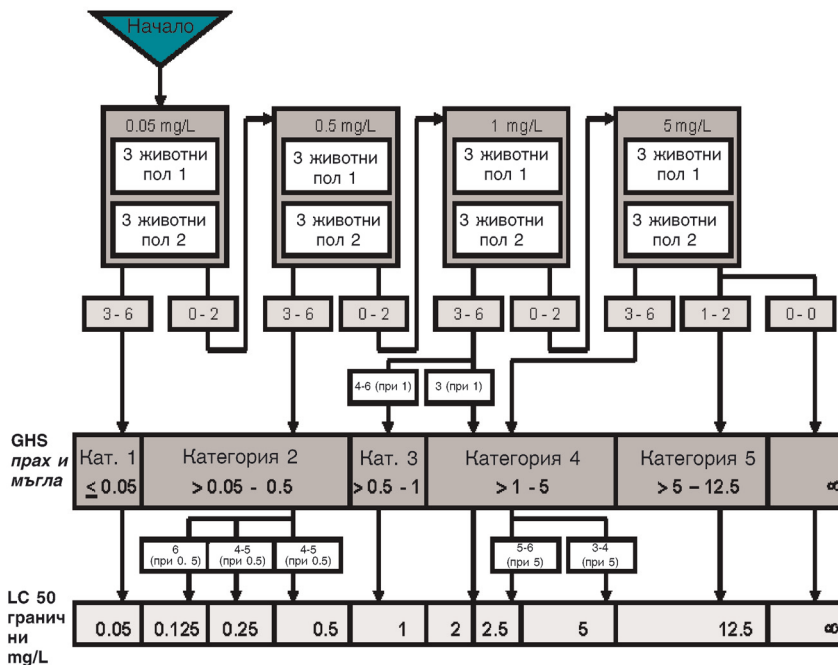
---

<sup>(1)</sup> В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламен (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

Допълнение 4а

Остра инхалаторна токсичност

Процедура на изпитване с начална концентрация от 0,05 mg/L/4h за пари

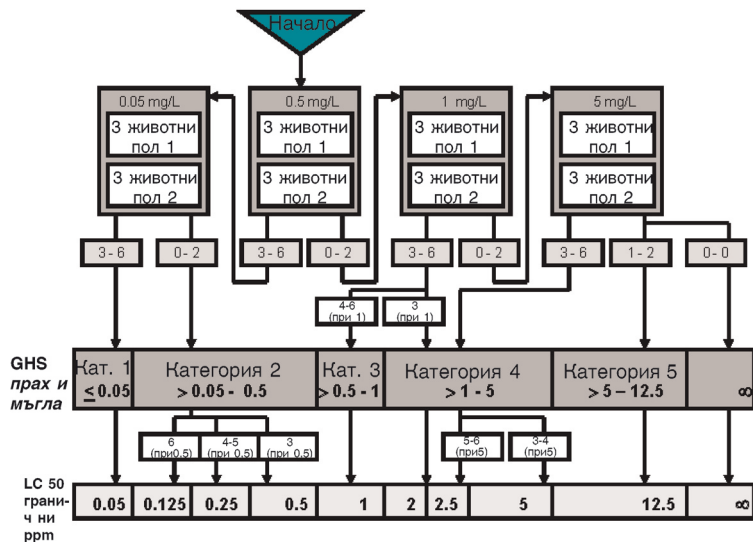


- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклаифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

Допълнение 4б

Остра инхалаторна токсичност

Процедура на изпитване с начална концентрация от 0,5 mg/L/4h за аерозоли



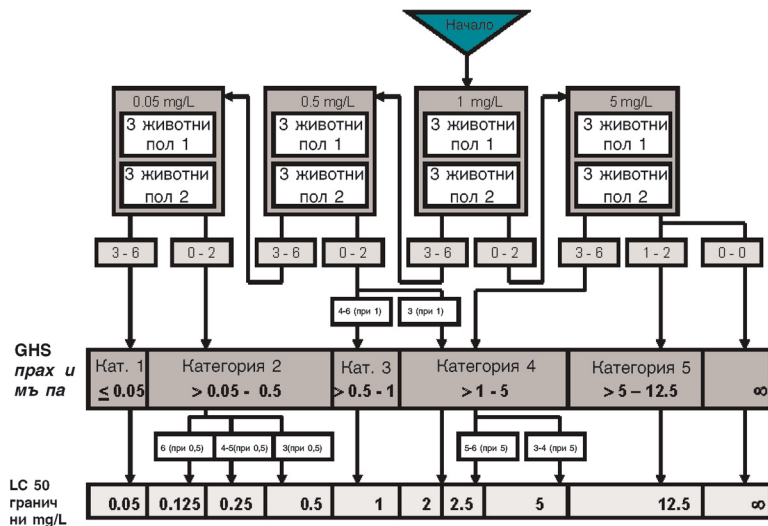
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неklasифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)



Допълнение 4в

Остра инхалаторна токсичност

Процедура на изпитване с начална концентрация от 1 mg/L/4h за аерозоли

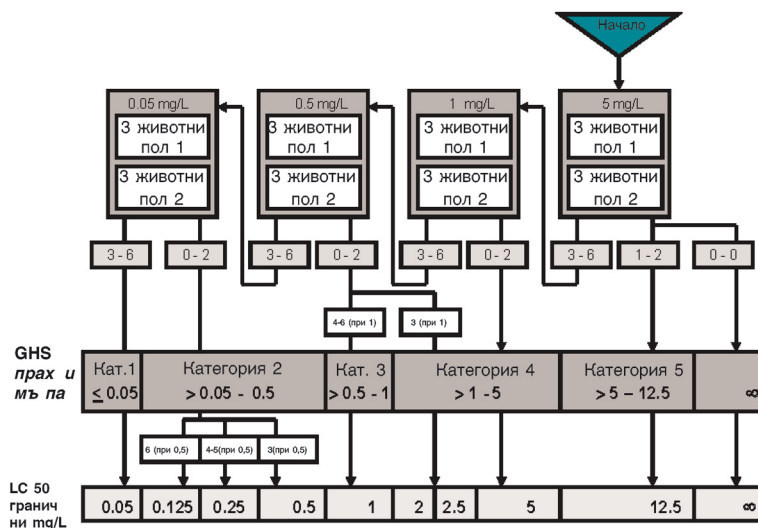


- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при 12,5 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

## Допълнение 4г

## Остра инхалаторна токсичност

## Процедура на изпитване с начална концентрация от 5 mg/L/4h за аерозоли



- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклаифицирано
- Изпитване при 12,5 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)\*

9) Глава В.10 се заменя със следното:

**„В.10. ИЗПИТВАНЕ ЗА СИМУЛИРАНЕ НА АЕРОБНО ПРЕЧИСТВАНЕ НА ОТПАДЪЧНИ ВОДИ: В.10-А: МОДУЛИ С АКТИВНА УТАЙКА — В.10-Б: БИОФИЛМИ**

**В.10-А: Модули с активна утайка**

**ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 303 (2001). През петдесетте години бе установено, че нововъведените повърхностноактивни вещества предизвикват прекомерно образуване на пяна в станциите за пречистване на отпадъчни води и реките. При аеробна обработка посочените вещества не се елиминираха напълно, а в някои случаи ограничаваха елиминирането и на други органични вещества. Това доведе до извършването на многобройни изследвания, чийто обект бяха начините да бъдат елиминирани повърхностноактивните вещества от отпадъчните води, както и съвместимостта на новите химикали, произведени от промишлеността, с пречистването на отпадъчните води. За изследванията бяха използвани модели на модули, представящи двата основни типа аеробна биологична обработка на отпадъчните води (с активна утайка и с капещи биофилтри). Би било твърде трудно и скъпо да се разпространява всеки нов химикал в големите пречиствателни станции и да се наблюдава провеждането на изпитвания, дори и на местно равнище.

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

**Модули с активна утайка**

2. Описани са образци на модули с активна утайка, чиято вместимост варира от 300 ml до около 2 000 ml. Някои от тях в голяма степен наподобяват истински пречиствателни станции, като имат утайтел, от който утаната утайка се изпомпва обратно в резервоар за аериране, докато други не са оборудвани с утайтел (напр. Swisher) (1). Размерът на апарата е компромис; от една страна, апаратът трябва да е достатъчно голям, за да може да функционира правилно и за да се осигури достатъчен обем на пробите, без да се нарушава действието му, а от друга страна, размерите му не трябва да изискват прекалено много място и материали.

3. Досега двата модела апарати, които са били широко и успешно използвани, са модулите на Husmann (2) и модулите с порест съд (3)(4), използвани първоначално за изучаване на повърхностноактивните вещества; те са описани в настоящия метод за изпитване. Успешно са използвани и други модели, напр. модел на Eckenfelder (5). Поради относително високата цена и усилията за прилагане на това изпитване за симулиране, успоредно бяха проучени и по-прости и по-евтини пресяващи изпитвания, които сега са въведени в глава В.4 А—Е от настоящото приложение. Опитът с много повърхностноактивни вещества и други химикали показва, че онези от тях, които преминават пресяващото изпитване (за лесна биоразградимост), също се разграждат в изпитването за симулиране. Някои от веществата, които не са преминали пресяващите изпитвания, са преминали изпитванията за присъща биоразградимост (глави В.12 (7) и В.19 (8) от настоящото приложение), но само някои от последните са били разградени в изпитването за симулиране, докато химическите вещества, които не са преминали изпитванията за присъща биоразградимост, не се разграждат при изпитванията за симулиране (9)(10)(11).
4. За определени цели са достатъчни и изпитванията за симулиране, проведени при един набор от работни условия. резултатите се изразяват като процент на елиминиране на изпитвания химикал или на разтворения органичен въглерод (DOC). В настоящия метод за изпитване се дава и описание на такова изпитване. За разлика обаче от предишната версия на настоящата глава, в която се описва само един тип апарати за третиране на синтетични отпадъчни води в режим на свързани модули при използване на относително груб метод за изразходване на утайка, настоящият текст предлага редица изменения. Описани са алтернативни варианти по отношение на типовете апарати, начина на действие, отстраняването на изразходваните отпадъчни води и утайки. Настоящият текст следва стриктно текста на ISO 11733 (12), който беше старателно проверен при подготовката му, въпреки че методът не беше обект на кръгово изпитване.
5. За други цели се изисква концентрацията на изпитвания химикал в изходящите отпадъчни води да се определи по-точно, а за това е необходим по-обхватен метод. Например, скоростта на изразходване на утайката трябва да се контролира по-прецизно всеки ден по време на периода на изпитването, а модулите трябва да се задействат с набор от различни стойности на скоростта на изразходване. За да може методът да бъде пълен, изпитванията трябва да се проведат при две или три различни стойности на температурата: такъв метод е описан от Birch (13) (14), а обобщение на метода е представено в допълнение 6. настоящото равнище на познанията обаче е все още недостатъчно, за да се определи кои от кинетичните модели са приложими към биоразграждането на химикалите при обработката на отпадъчните води и изобщо във водна среда. Прилагането на кинетичния модел на Моно, посочен като пример в приложение 6, е ограничено до химикали, налични в концентрации от 1 mg/l и по-високи, но според някои дори и това се нуждае от доказателство. В допълнение 7 се изисква и провеждането на изпитвания при концентрации, които по-вярно отразяват концентрациите, констатирани в отпадъчните води, но подобни изпитвания, както и изпитванията от приложение 6, са включени в допълненията, вместо да бъдат оформени като самостоятелни методи за изпитване.

#### Филтри

6. Обръщано е по-малко внимание на моделиране на капещи биофилтри, може би защото оборудването за моделиране е с по-големи размери и е по-малко компактно от моделите на инсталации с активна утайка. Gerike *et al.* са разработили модули с капещ биофилтър и са ги използвали в режим на свързани модули (15). Посочените филтри са относително големи (с височина 2 m; обем 60 l) и всеки от тях е изисквал по 2 l/h отпадъчни води. Baumann *et al.* (16) моделират капещи филтри, като пълният тръби с дължина 1 m и вътрешен диаметър 14 mm с ленти от полиестерен памук, след като последните са били потопени в концентрирана активна утайка за 30 min. Изпитваният химикал, който е единственият източник на въглерод в разтвор на минерални соли, се подава надолу по вертикално поставената тръба и се оценява биоразграждането чрез измерване на DOC в изходящите води и на съдържанието на CO<sub>2</sub> в отделящия се газ.
7. Биофилтрите са били моделирани и по друг начин (15); към вътрешните повърхности на въртящи се тръби, наклонени под малък ъгъл спрямо хоризонталата, се подават отпадъчни води (около 250 ml/h), съответно със или без изпитвания химикал, като събраните изходящи води се анализират за DOC и/или за конкретния изпитван химикал.

#### ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

8. С настоящия метод се цели да се определи отстраняването и първичното и/или окончателното биоразграждане на водоразтворими органични химикали от аеробни микроорганизми в изпитвателна система с непрекъснато действие, при която се моделира процес с участие на активна утайка. Източниците на въглерод и енергия за микроорганизмите са податливата на биоразграждане органична среда и органичният изпитван химикал.
9. При идентични условия, избрани така, че да съответстват на целите на изпитването, се задействат успоредно два изпитвателни модула с непрекъснато действие (станции с активна утайка или порести съдове). Обикновено средното време на задържане в течността е 6 h, а средната възраст на утайката (време на задържане на утайката) е 6 до 10 дни. Утайката се изразходва по един от два метода, изпитваният химикал обикновено се добавя в концентрация между 10 mg/l и 20 mg/l разтворен органичен въглерод (DOC) към подаваната течност (органичната среда) на само единия от модулите. Вторият модул се използва като контролен модул за определяне на биоразграждането на органичната среда.
10. В често вземани проби от изходящите води на модула, в който е въведен изпитвания химикал, с помощта на специфични анализи се определя DOC (за предпочитане) или химично потребният кислород (ХПК), както и концентрацията на изпитвания химикал (ако се изисква). Приема се, че разликата между концентрацията на DOC или ХПК в изходящите води на изпитвателния и на контролния модул се дължи на изпитвания химикал или на органичните му метаболити. За да се определи елиминирането на изпитвания химикал, разликата се сравнява с концентрацията на DOC или ХПК във входящите води, дължаща се на добавения изпитван химикал.

11. По принцип биоразграждането може да се различава от биоадсорбцията чрез внимателно разглеждане на кривата на елиминирането във времето и обикновено може да се потвърди чрез извършване на изпитване за лесна биоразградимост, като се използва аклиматизиран инокулум от модула, в който се подава изпитваният химикал.

#### ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

12. Необходимо е да са известни чистотата, водоразтворимостта, летливостта и адсорбционните характеристики на изпитвания химикал, за да е възможно да се извърши правилно тълкуване на резултатите. По принцип летливите и неразтворимите химикали не могат да бъдат изпитвани, освен ако не са взети специални предпазни мерки (вж. допълнение 5). Необходимо е да е известна също и химичната структура или най-малко емпиричната формула, за да се изчисляват теоретичните стойности и/или да се проверяват измерените стойности на параметрите, например теоретично потребният кислород (ТПК), разтвореният органичен въглерод и химично потребният кислород (ХПК).
13. Информацията за токсичността на изпитвания химикал спрямо микроорганизми (вж. допълнение 4) може да бъде полезна при избирането на подходящи концентрации за изпитване и може да бъде особено важна за правилното тълкуване при ниски стойности на биоразграждането.

#### ПРАГОВИ НИВА

14. При първоначалното провеждане на това (потвърдително) изпитване за симулиране на първичната биоразградимост на повърхностноактивните вещества, за пускането на дадено повърхностноактивно вещество на пазара се изискваше елиминирането на повече от 80 % от конкретния химикал. Ако не е постигната стойността от 80 %, може да се приложи (потвърдително) изпитване за симулиране и повърхностноактивното вещество да се пусне на пазара, само ако повече от 90 % от конкретния химикал бъде елиминиран. По принцип към химикалите не се подхожда според положителния или отрицателния резултат от изпитване, и стойността в проценти на постигнатото елиминиране може да се използва в приблизителни изчисления на вероятната концентрация в околната среда, която да се използва в оценките на риска, който химикалите пораждаат. Налице е тенденция резултатите да следват схема „всичко или нищо“. В множество изследвания на чисти химикали стойността в проценти на елиминирането на DOC бе над 90 % при повече от три четвърти и над 80 % при повече от 90 % от химикалите, показали значителна степен на биоразградимост.
15. Относително малко химикали (напр. повърхностноактивни вещества) са налични в отпадъчните води в концентрацията (около 10 mg C/l), която се използва в настоящото изпитване. Някои химикали може да имат инхибиращо въздействие при тези концентрации, докато кинетиката на елиминирането на други може да е различна при ниски концентрации. По-точна оценка на разграждането може да се извърши, като се използват модифицирани методи и близки до действителните ниски концентрации на изпитвания химикал, а събраните данни могат да се използват за изчисляване на кинетични константи. Все още обаче необходимите експериментални техники не са напълно валидирани, нито пък са установени кинетичните модели, които описват реакциите на биоразграждане (вж. допълнение 7).

#### РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

16. За да се гарантира, че експерименталната процедура се изпълнява правилно, полезно е понякога да се изпитват химикали, чието поведение е познато, успоредно с проучването на изпитваните химикали. Такива химикали са например алипиновата киселина, 2-фенилфенолът, 1-нафтолът, дифеновата киселина, 1-нафтоената киселина и др. (9) (10) (11).

#### ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНИЯТА

17. Налични са много по-малко доклади за изследвания въз основа на изпитвания за симулиране, отколкото за изпитвания за лесна биоразградимост. Възпроизводимостта между (едновременно провеждани) повторения е добра (в рамките на 10—15 %) за изпитваните химикали, които се разграждат до 80 % или повече, но за трудни разградимите химикали варирането е по-високо. Освен това, при различни обстоятелства в рамките на 9-те седмици, определени за изпитването, при някои гранични химикали са отчетени силно различаващи се резултати (напр. 10 %, 90 %).
18. Резултатите, получени с двата типа апарати, не се различават съществено, но някои химикали се разграждат в по-голяма степен и по-пълно в битови отпадъчни води, отколкото в синтетични отпадъчни води по ОИСР.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

##### Апаратура

##### Системи за изпитване

19. Системата за изпитване за един изпитван химикал се състои от изпитвателен модул и контролен модул; ако обаче се извършват само специфични анализи (първично биоразграждане), се изисква само изпитвателен модул. Един контролен модул може да се използва за множество изпитвателни модули, в които се въвежда един и същ химикал или различни химикали. При свързване (допълнение 3) всеки изпитвателен модул трябва да има собствен контролен модул. Изпитвателната система може да бъде модел на станция с активна утайка, модул на Huisman (допълнение 1, фигура 1) или модул с порест съд (допълнение 1, фигура 2). И в двата случая са необходими съдове с подходящ размер за събиране на входящите и на изходящите води, както и помпи за дозиране на входящите води, или смесени с разтвора на изпитвания химикал, или поотделно.

20. Всеки модул за активна утайка се състои от съд за аериране с известна вместимост от около 3 литра активна утайка и сепаратор (вторичен утаител) с вместимост около 1,5 литра; обемите могат да се променят до известна степен чрез коригиране на височината на утаителя. Допускат се и съдове с друг размер, ако се подлагат на съпоставими хидравлични натоварвания. Ако не е възможно температурата в помещението, в което се провежда изпитването, да се поддържа в желаните граници, се препоръчва използването на съдове с водна риза с термостат. Активната утайка се връща непрекъснато или на равни интервали от сепаратора в съда за аериране, като се използва въздушна (ерлифт) или дозираща помпа.
21. Системата с порест съд се състои от вътрешен порест цилиндър с конусообразно дъно, поставен в малко по-голям съд със същата форма, но изработен от непроницаема пластмаса. Подходящ материал за порестия съд е порест полиетилен с максимален размер на порите 90  $\mu\text{m}$  и дебелина 2 mm. Отделянето на утайката от третирания органична среда се осъществява чрез диференциално преминаване през порестата стена. Изходящата течност се събира в пръстеновидното пространство, откъдето прелива в събирателния съд. Тъй като няма утаяване, няма и връщане на утайката. Цялата система може да бъде монтирана в контролирана чрез термостат водна баня. На началните етапи, порестите контейнери се запущват и могат да прелеят. В такъв случай порестата облицовка се заменя с чиста такава, като първо утайката се изпомпва в чиста кофа, а запушената облицовка се изважда. След като се избърше непроницаемият външен цилиндър, се слага чиста облицовка и утайката се връща в контейнера. Ако по стените на запушената облицовка остане утайка, тя трябва да се остърже и прехвърли. Запушените контейнери се почистват, като се използва тънка струя вода, за да се отмие останалата утайка, контейнерът се наксисне първо в разреден разтвор на натриев хипохлорит, а после във вода и след това се изплакне обилно с вода.
22. За аерацията на утайката в съдовете за аериране в двете системи се изискват подходящи техники, например синтеровани кубове (дифузорни камъни) и въздух под налягане. Ако е необходимо, въздухът се пречиства чрез пропускане през подходящ филтър и се промива. През системата трябва да преминава достатъчно въздух, така че да се запазват аеробните условия и парчетата утайка да се поддържат в суспензия през цялото времетраене на изпитването.

*Апарат за филтруване или центрофуга*

23. Устройство за филтруване на проби с мембранни филтри с подходящ размер на порите (номинален диаметър на отворите 0,45  $\mu\text{m}$ ), които абсорбират разтворимите органични химикали и освобождават органичен въглерод в минимална степен. Ако се използват филтри, които освобождават органичен въглерод, те грижливо се промиват с гореща вода, за да се отстрани отмиваемият органичен въглерод. Като алтернатива може да използва центрофуга, която е в състояние да развие 40 000  $\text{m/s}^2$ .

*Аналитично оборудване*

24. Апарати, позволяващи да се определи:

- DOC (разтвореният органичен въглерод) и TOC (общият органичен въглерод), или ХПК (химически потребният кислород),
- специфичен химикал, ако се изисква,
- твърди вещества в суспензия, рН, концентрация на кислорода във водата,
- температура, киселинност и алкалност,
- амониеви йони, нитрити и нитрати, ако изпитването се провежда в условията на азотфиксиране.

*Води*

25. Чешмяна вода със съдържание на DOC по-малко от 3 mg/l. Определя се алкалността, ако не е вече известна.
26. Дейонизирана вода със съдържание на DOC по-малко от 2 mg/l.

*Органична среда*

27. В качеството на органична среда се допуска използването на синтетични отпадъчни води, битови отпадъчни води, или на смес от тях. Беше доказано (11) (14), че използването само на битови отпадъчни води често води до повишено елиминиране на DOC и дори позволява елиминирането и биоразграждането на някои химикали, които не са биоразградими при използване на синтетични отпадъчни води по рецептурата на ОИСР. Също така, добавянето, постоянно или на порции, на битови отпадъчни води често стабилизира активната утайка, включително и способността на последната добре да се утаява. Поради това се препоръчва използването на битови отпадъчни води. Следва да се измерва концентрацията на DOC или ХПК във всяка нова партида органична среда. Киселинността или алкалността на органичната среда следва да бъде известна. Може да се наложи в органичната среда да се добави подходящ буфер (натриев хидрогенкарбонат или калиев дихидрогенфосфат), ако тя е с ниска киселинност или алкалност, за да се поддържа рН от около  $7,5 \pm 0,5$  в съда за аериране по време на изпитването. Количеството на необходимия буфер, както и моментът на добавянето трябва да се определят във всеки конкретен случай. Когато непрекъснато или периодически се използват смеси, стойността на DOC (или ХПК) на сместа трябва да се поддържа приблизително постоянна, например чрез разреждане с вода.

*Синтетични отпадъчни води*

28. В литър чешмяна вода се разтварят: пептон, 160 mg; месен екстракт, 110 mg; уреа, 30 mg; безводен дикалиев хидрогенфосфат ( $K_2HPO_4$ ), 28 mg; натриев хлорид (NaCl) 7 mg; калциев хлорид дихидрат ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), 4 mg; магнезиев сулфат хептахидрат ( $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ ), 2 mg. Тези синтетични отпадъчни води по ОИСП са примерни, като те осигуряват средна концентрация на DOC във входящите води от около 100 mg/l. Като алтернатива е възможно използването на друг състав с приблизително същата концентрация на DOC, който е близък до състава на истинските отпадъчни води. Ако се изисква използването на по-малко концентрирана входяща течност, синтетичните отпадъчни води се разреждат, например в съотношение 1:1, с чешмяна вода, за да се получи концентрация от около 50 mg/l. Така разредените входящи води ще осигурят по-добри условия за растеж на нитрифициращите организми и това изменение следва да се използва, ако се налага изпитване за симулиране на пречиствателни станции, работещи при условия на нитрифициране. Синтетичните отпадъчни води могат да бъдат приготвени с дестилирана вода в концентрирана форма, и да се съхраняват при температура около 1 °C до една седмица. Когато е необходимо, те се разреждат с чешмяна вода. (Тази среда е незадоволителна — напр. концентрацията на азот е много висока, съдържанието на въглерод е относително ниско, но не е предложено нищо по-добро, освен да се добави още фосфат като буфер и допълнително количество пептон).

*Битови отпадъчни води*

29. Използват се пряко утаени отпадъчни води, събирани ежедневно от пречиствателните станции, приемащи предимно битови отпадъчни води. Те трябва да се събират, преди да се подложат на първично утаяване, от преливника на първия утайтел, или от входа на пречиствателна станция с активна утайка, и почти да не съдържат груби частици. Отпадъчните води може да се използват след съхранение в продължение на няколко дни (но обикновено не повече от седем дни) при около 4 °C, ако се докаже, че стойността на DOC (или ХПК) не е намалела значително (т.е. с по-малко от 20 %) по време на съхранението. С цел да се ограничат смущенията в системата, стойността на DOC (или ХПК) на всяка нова партида следва да се коригира преди употреба до подходяща постоянна стойност, например чрез разреждане с чешмяна вода.

*Активна утайка*

30. За инокулацията се взема активна утайка от резервоара за аериране на правилно експлоатирана пречиствателна станция за отпадъчни води или от лабораторен модул с активна утайка, които преработват предимно битови отпадъчни води.

*Изходни разтвори на изпитвания химикал*

31. От химикалите с добра разтворимост се приготвят изходни разтвори с подходяща концентрация (напр. от 1 до 5 g/l) в дейонизирана вода или в минералната част на синтетичните отпадъчни води. (за неразтворими и летливи химикали, вж. допълнение 5). Определят се DOC и общият органичен въглерод (TOC) на изходния разтвор, като измерванията се повтарят за всяка нова партида. Ако разликата между DOC и TOC е по-голяма от 20 %, проверява се разтворимостта във вода на изпитвания химикал. DOC или концентрацията на изпитвания химикал, измерени чрез специфичен анализ на изходния разтвор, се сравняват с номиналната стойност, за да се установи дали добивът е достатъчно добър (обикновено може да се очаква добив > 90 %). Проверява се, по-специално за дисперсии, дали DOC може да се използва като параметър за анализ, или може да се използва само аналитична техника, специфична за изпитвания химикал. При дисперсии се изисква центрофугиране на пробите. За всяка нова партида чрез специфичен анализ се определят DOC, ХПК или изпитваният химикал.
32. Определя се рН на изходния разтвор. Получаването на екстремни стойности означава, че добавянето на химикала може да повлияе на рН на активната утайка в системата за изпитване. В този случай изходният разтвор се неутрализира за получаване на стойност на рН, равна на  $7 \pm 0,5$  с малки количества неорганична киселина или основа, като се избягва утаяване на изпитвания химикал.

*ПРОЦЕДУРА*

33. Описаната процедура е за модули с активна утайка; за система с порест съд тя трябва да бъде леко адаптирана.

*Приготвяне на инокулум*

34. В началото на изпитването системата за изпитване се инокулира с активна утайка или с инокулум с ниска концентрация на микроорганизми. Преди употреба инокулумът се съхранява в проветриво място при стайна температура и се използва в рамките на 24 h. В първия случай се взема проба активна утайка от резервоара за аериране на ефикасно работеща биологична пречиствателна станция за отпадъчни води или от лабораторна пречиствателна станция, която получава предимно битови отпадъчни води. Ако трябва да се симулират нитрифициращи условия, взема се утайка от пречиствателна станция за отпадъчни води, която работи при условия на нитрификация. Определя се концентрацията на суспендираните твърди вещества и, ако е необходимо, извършва се концентриране на утайката чрез утаяване, така че добавеният към системата за изпитване обем да е минимален. Вземат се мерки началната концентрация на сухо вещество да бъде около 2,5 g/l.
35. Във втория случай като инокулум се използват 2 ml/l до 10 ml/l от изходящите води от биологична пречиствателна станция за битови отпадъчни води. За да се осигури наличието на възможно най-много различни видове бактерии, може да се окаже полезно да се добави инокулум от различни други източници, например повърхностни води. В този случай активната утайка ще се развива и расте в системата за изпитване.

*Дозирание на органичната среда*

36. Следва да се гарантира, че контейнерите за входящите и за изходящите води, а също и тръбите от едните към другите, са старателно почистени, за да се предотврати микробен растеж в началото на изпитването и по време на самото изпитване. Системите за изпитване се сплъбват в помещения, където температурата се контролира (обикновено в интервала 20—25 °C) или се използват модули с водна риза. Подготвя се достатъчен обем от изискваната органична среда (точки 27—29). Първоначално съдът за аериране и утайтелят се напълват с органична среда и се добавя инокулумът (точки 34—35). Задейства се устройството за аериране така, че утайката се поддържа в суспензия и в аеробно състояние, и се започва дозирането на входящите води и рециклирането на утаената утайка. Органичната среда от съдовете за съхранение се дозира в съдовете за аериране (точки 20—21) на изпитвателния и контролния модул и се събират съответните изходящи води в подобни съдове за съхранение. За да се осигури нормално време на задържане на течността, равно на 6 часа, органичната среда се изпомпва с дебит 0,5 l/h. За да се потвърди този дебит, измерва се дневното дозирано количество органична среда, като се отбелязва намаляването на обемите на средата в съдовете за съхранение. За определяне на въздействието на периодичното освобождаване и „ударното“ въвеждане на химикали ще са необходими други режими на дозиране.
37. Ако органичната среда се приготвя за употреба за период, по-дълъг от един ден, необходимо е охлаждане до около 4 °C или други подходящи методи за запазване и предотвратяване на микробен растеж и биологично разграждане извън изпитвателните модули (точка 29). Ако се използват синтетични отпадъчни води, възможно е да се подготви концентриран изходен разтвор (напр. с концентрация 10 пъти по-висока от нормалната, точка 28), който да се съхранява при температура от около 4 °C. Преди употреба изходният разтвор може да се смесва по подходящ начин със съответния обем чешмяна вода; възможно е вместо това разтворът да се въвежда пряко, а съответното количество чешмяна вода да се подава отделно.

*Дозирание на изпитвания химикал*

38. Съответният обем изходен разтвор на изпитвания химикал се дозира (точка 31) в съда за съхранение на входящите води или се дозира пряко с отделна помпа в съда за аериране. Нормалната средна концентрация на изпитване във входящите води следва да е между 10 mg/l и 20 mg/l DOC, като горната граница на концентрацията е не по-висока от 50 mg/l. Ако разтворимостта във вода на изпитвания химикал е малка, или ако е вероятно да се прояви токсично въздействие, концентрацията може да се намали до 5 mg/l или дори по-малко, но само ако е наличен подходящ специфичен метод за анализ и той се прилага (могат да се добавят диспергирани малко разтворими във вода изпитвани химикали, като се използват специални техники за дозиране, вж. допълнение 5).
39. Започва се добавянето на изпитвания химикал след период, през който системата се е стабилизирала и е започнала ефикасно (около 80 %) да елиминира DOC на органичната среда. Преди да се добави изпитваният химикал, е важно да се провери дали всички модули работят еднакво ефикасно; ако това не е така, смесването на утайката от отделните модули и разпределянето на равни обеми от нея в отделните модули обикновено помага. Когато се използва инокулум от (приблизително) 2,5 g/l (сухо тегло) активна утайка, изпитваният химикал може да бъде добавен още в началото на изпитването, тъй като прякото добавяне на нарастващи количества от началото има предимството, че създава условия активната утайка да може по-добре да се приспособи към изпитвания химикал. Независимо от начина на добавяне на изпитвания химикал, препоръчва се съответните дебит и/или обем(и) в съда(съдовете) за съхранение редовно да се измерват.

*Боравене с активната утайка*

40. Независимо от инокулума, по време на изпитването концентрацията на твърди вещества в активната утайка обикновено се стабилизира между граничните стойности от 1 до 3 g/l (сухо тегло) в зависимост от качеството и концентрацията на органичната среда, работните условия, естеството на наличните микроорганизми и въздействието на изпитвания химикал.
41. Или поне веднъж седмично се определят суспендираните твърди вещества в съдовете за аериране и излишната утайка се отстранява, за да се поддържа концентрация от 1 g/l до 3 g/l (сухо тегло), или се контролира средната възраст на утайката да бъде постоянна величина, обикновено в интервала от 6 до 10 дни. Ако например избраното средно време на задържане на утайката е 8 дни, ежедневно се отстранява 1/8 от обема на активната утайка в съда за аериране и се изхвърля. Описаните действия се извършват ежедневно или, за предпочитане, се използва автоматична помпа, която се задейства на определени интервали. Запазването на постоянна, или изменяща се в тесни граници концентрация на суспендираните твърди вещества не спомага да се поддържа постоянно време на задържане на утайката, което е променливата, определяща стойността на концентрацията на изпитвания химикал в изходящите води.
42. През цялото времетраене на изпитването поне веднъж на ден се отстранява всякаква утайка, поленнала по стените на съда за аериране и утайтеля, така че тя да премине обратно в суспензия. Всички тръби редовно се проверяват и чистят, за да се предотврати растежът на биофилм. Утаената утайка се рециклира от утайтеля в съда за аериране, за предпочитане чрез помпи, които се задействат на определен интервал. В системата с порест съд не се извършва рециклиране, но трябва да се гарантира, че са поставени чисти вътрешни контейнери, преди обемът в съда да се е повишил значително (точка 21).
43. При модули от тип „Husmann“ може да се получи лошо утаяване или загуба на утайка. На това може да се противодейства, като едновременно в изпитвателните и в контролните модули се предприеме едно или няколко от изброените по-долу действия:

- на равни интервали, напр. седмично, може да се добавя прясна утайка или флокулант (например 2 ml/съд  $\text{FeCl}_3$  с концентрация 50 g/l), но трябва да се удостоверят, че добавянето на  $\text{FeCl}_3$  не води до реакция или утаяване на изпитвания химикал,
- ерлифтната помпа може да бъде заменена от перисталтична помпа, като по този начин се създава възможност да се използва потокът от рециркулирана утайка, чийто обем е приблизително равен на този на постъпващата течност, и да се създаде анаеробна зона в утаената утайка (геометрията на ерлифтната помпа налага ограничението минималният дебит на върнатата утайка да бъде около 12 пъти този на входящите води),
- утайката може да се изпомпва на определени интервали от сепаратора към съда за аериране (напр. 5 min. на всеки 2,5 h за рециклиране на 1 l/h до 1,5 l/h),
- за да се предотвратят загуби поради образуване на пяна, може да използват нетоксични антипенители при минимална концентрация (напр. силиконово масло),
- през утаената в утаителя утайка може да се пропуска въздух на кратки мощни вълни (напр. 10 сек. на всеки час),
- органичната среда може да бъде дозирана на определени интервали в съда за аериране (напр. 3 до 10 минути на всеки час).

#### *Вземане на проби и анализ*

44. Редовно се измерват концентрацията на разтворения кислород, температурата и стойността на рН на активната утайка в съдовете за аериране. Гарантира се, че винаги има достатъчно количество кислород ( $> 2 \text{ mg/l}$ ) и че температурата се поддържа в необходимия обхват (обикновено  $20^\circ\text{C}$  до  $25^\circ\text{C}$ ). Стойността на рН се поддържа равна на  $7,5 \pm 0,5$  с помощта на дозиране на малки количества неорганична основа или киселина в съда за аериране или във входящите води, или чрез увеличаване на буферния капацитет на органичната среда (вж. точка 27). Когато протича нитрификация, се получава киселина, като окисляването на  $1 \text{ mg N}$  произвежда еквивалента на около  $7 \text{ mg CO}_3^{2-}$ . Честотата на измерване зависи от подлежащия на измерване параметър и от стабилността на системата и може да варира от измервания ежедневно до веднъж седмично.
45. Измерва се DOC (или ХПК) на водите, с които се захранват контролните съдове и съдовете за провеждане на изпитването. С помощта на специфичен анализ се измерва концентрацията на изпитвания химикал в изпитваните входящи води или те се изчислява въз основа на концентрацията на изходния разтвор (точка 31), използвания обем и количеството на отпадъчните води, дозирани в изпитвателния модул. С цел да се намали варирането на данните за концентрацията, препоръчва се концентрацията на изпитвания химикал да се изчислява.
46. Вземат се подходящи проби от събраните изходящи води (напр. такива, които са събрани 24 часа) и се филтрират през мембранен филтър с размер на порите  $0,45 \mu\text{m}$  или се центрофугират при около  $40\,000 \text{ m/s}^2$  в продължение на около 15 мин. Центрофугирането трябва да се използва, ако е трудно да се извърши филтриране. С помощта на анализ, специфичен за изпитвания химикал, се определя DOC (или ХПК) най-малко два пъти за измерване на крайното и, ако се изисква, на първичното биоразграждане.
47. Използването на ХПК може да доведе до проблеми по отношение на анализа при ниски концентрации и поради това то се препоръчва, само ако концентрацията при изпитването е достатъчно висока (около  $30 \text{ mg/l}$ ). Освен това, при силно адсорбируеми химикали се препоръчва количеството адсорбиран химикал в утайките да се измерва, като се използва метод за анализ, специфичен за изпитвания химикал.
48. Честотата на вземане на проби зависи от очакваната продължителност на изпитването. Препоръчителната честота е три пъти на седмица. След като се постигне ефикасно функциониране на модулите, се изчаква от 1 до максимум 6 седмици след въвеждането на изпитвания химикал, за адаптиране с оглед постигане на стационарно състояние. За да се оценят резултатите от изпитването, за предпочитане е да се получат най-малко 15 валидни стойности по време на фазата на плато (точка 59), която обикновено е с продължителност 3 седмици. Изпитването може да бъде приключено, ако е постигната достатъчна степен на елиминиране (напр.  $> 90\%$ ) и са на разположение 15-те стойности, които представляват анализи, извършвани всеки работен ден в период от три седмици. Обикновено изпитванията не трябва да продължават повече от 12 седмици след добавянето на изпитвания химикал.
49. Ако утайката претърпява нитрификация и ако трябва да се проучи въздействието на изпитвания химикал върху нитрификацията, пробите от изходящите води от контролния и от изпитвателния модул се анализират поне веднъж седмично за амониев йони, и/или нитрити плюс нитрати.
50. Всички анализи се извършват възможно най-бързо, особено определянето на съдържанието на азот. Ако се налага отлагане на анализите, пробите се съхраняват при около  $4^\circ\text{C}$  на тъмно в пълни догоре и плътно запушени бутилки. Ако се налага пробите да се съхраняват повече от 48 часа, те трябва да се съхраняват чрез дълбоко замразяване, ацидификация (напр.  $10 \text{ ml/l}$  разтвор на сярна киселина с концентрация  $400 \text{ g/l}$ ) или чрез добавяне на подходящо токсично вещество (напр.  $20 \text{ ml/l}$  разтвор на живачен(II) хлорид с концентрация  $10 \text{ g/l}$ ). Трябва да се вземат мерки техниките за съхранение да не влияят върху резултатите на анализа.



*Свързване на изпитвателните модули*

51. Ако трябва да се използва свързване (допълнение 3), всеки ден трябва да се извършва обмен на едно и също количество активна утайка (150—1 500 ml при съдове за аериране, събиращи 3 литра активна утайка) между съда за аериране на изпитвателния и този на неговия контролен модул. Ако активната утайка силно адсорбира изпитвания химикал, се извършва обмен само на супернатанта в утайките. И в двата случая при изчисляването на резултатите от изпитването се използва корекционен коефициент (точка 55).

## ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

**Обработка на резултатите**

52. Изчислява се процентът на елиминиране на изпитвания химикал, въз основа на данните за DOC или ХПК за всяка предвидена във времето оценка, като се използва уравнението:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_0)}{C_s} \times 100$$

където

$D_t$  = на DOC или ХПК в момент  $t$

$C_s$  = DOC или ХПК във входящите води, дължащи се на изпитвания химикал, за предпочитане стойност, очаквана въз основа на изходния разтвор (mg/l)

$E$  = измерена стойност на DOC или на ХПК в изпитваните изходящи води в момент  $t$  (mg/l)

$E_0$  = измерена стойност на DOC или ХПК в контролните изходящи води в момент  $t$  (mg/l)

53. Степента на елиминиране на DOC или ХПК на органичната среда в контролния модул е полезна информация при оценката на биоразграждането, извършвано от активната утайка по време на изпитването. Процентът на елиминиране се изчислява с уравнението:

$$D_B = \frac{C_M - E_0}{C_M} \times 100$$

където

$D_B$  = на DOC или ХПК на органичната среда в контролния модул в момент  $t$

$C_M$  = DOC или ХПК на органичната среда във входящите води на контролния модул в момент  $t$

Без да е задължително, може да се изчисли процентът на елиминиране на DOC или ХПК, дължащи се на органичната среда и изпитвания химикал в изпитвателния модул, като се използва уравнението:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

където

$D_T$  = процент на елиминиране на DOC или ХПК във всички изпитвани входящи води

$C_T$  = DOC или ХПК на всички изпитвани входящи води или изчислени въз основа на изходния разтвор (mg/l)

54. Изчислява се елиминирането на изпитвания химикал, ако последният е измерван със специфичен метод за анализ във всеки момент на оценката, като се използва уравнението:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

където

$D_{ST}$  = процент на първично елиминиране на изпитвания химикал в момент  $t$

$S_i$  = измерена или очаквана концентрация на изпитвания химикал в изпитваните входящи води (mg/l)

$S_e$  = измерена концентрация на изпитвания химикал в изпитваните изходящи води момент  $t$  (mg/l)

55. Ако е използван режим на свързване, разреждането на изпитвания химикал в съда за аериране се компенсира с обмена на утайка, с използването на корекционен коефициент (вж. допълнение 3). Ако средното време на задържане на течността е 6 часа и в съда за аериране е заменена половината от обема на активната утайка, за да се получат истинските стойности за степента на елиминиране  $D_{tc}$  на изпитвания химикал, определените дневни стойности на елиминирането ( $D_t$ , точка 52) трябва да се коригират с помощта на уравнението:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

#### Изразяване на резултатите от изпитването

56. Нанасят се графично стойностите на процента на елиминиране  $D_t$  (или  $D_{tc}$ ) и на  $D_{st}$ , ако са известни, в зависимост от времето (вж. допълнение 2). От формата на кривата на елиминирането на изпитвания химикал (като такъв или като DOC) могат да се направят някои изводи за процеса на елиминиране.

#### Адсорбция

57. Ако още в началото на изпитването се наблюдава силно елиминиране на изпитвания химикал, изразен като DOC, изпитваният химикал вероятно е елиминиран чрез адсорбция в твърдите вещества на активната утайка. Възможно е да се докаже това, като се определи адсорбираният изпитван химикал с помощта на специфичен анализ. Не е обичайно елиминирането на DOC на адсорбируеми химикали да се запазва високо през цялото изпитване. нормално е първоначално да е налице висока степен на елиминиране, която постепенно намалява до достигането на равновесна стойност. Ако обаче адсорбируемият изпитван химикал е способен да предизвика аклиматизиране на микробната популация по един или друг начин, степента на елиминиране на DOC на изпитвания химикал може по-късно да нарасне и да достигне до високи стойности в платото.

#### Латентна фаза

58. Както и в статичните пресяващи изпитвания, преди биоразграждането да се прояви изцяло при много изпитвани химикали се наблюдава латентна фаза. По време на латентната фаза, аклиматизирането или адаптирането на разграждащите бактерии протича при почти пълна липса на елиминиране на изпитвания химикал; след това започва първоначалният растеж на бактериите. Когато са елиминирани около 10 % от първоначалното количество от изпитвания химикал (след адсорбция, ако е протекла такава), тази фаза завършва и се счита, че започва фазата на разграждането. Латентната фаза често е много променлива и слабо възпроизводима.

#### Фаза на плато

59. Фазата на плато на кривата на елиминирането в непрекъснато изпитване се определя като фаза, по време на която разграждането е максимално. Фазата на плато следва да трае поне 3 седмици и да бъде определена от около 15 измерени валидни стойности.

#### Средна степен на елиминиране на изпитвания химикал

60. Средната стойност се изчислява въз основа на стойностите на елиминирането ( $D_t$ ) на изпитвания химикал във фазата на плато. След закръгляване към най-близкото цяло число (1 %) тя представлява степента на елиминиране на изпитвания химикал. Препоръчва се също да се изчисли и доверителен интервал от 95 % от средната стойност.

#### Елиминиране на органичната среда

61. Нанася се на кривата процентът на елиминиране на DOC или ХПК на органичната среда в контролния модул ( $D_B$ ) в зависимост от времето. Посочва се средната степен на елиминиране по същия начин както за изпитвания химикал (точка 60).

#### Признаци на биоразграждане

62. Ако изпитваният химикал не се адсорбира в значителна степен в активната утайка и кривата на елиминирането има типичната форма на крива на биоразграждане с латентна фаза, фаза на разграждане и фаза на плато (точки 58 и 59), измереното елиминиране може със сигурност да се обясни с биоразграждане. Ако е налице силно начално елиминиране, с изпитването за симулиране не може да се направи разграничаване между биологични и абиотични процеси на елиминиране. В подобни случаи, а и в други случаи, в които има съмнение по отношение на биоразграждането (напр. ако е настъпило разслояване), се предприема анализ на адсорбираните изпитвани химикали или се извършва допълнително статично изпитване за биоразграждане въз основа на параметри, ясно свидетелстващи за биологичен процес. Такива изпитвания са методите за определяне на потреблението на кислород (глава В.4 Г, Д и Е от настоящото приложение (6) или изпитване с измерване на отделянето на въглероден диоксид (глава В.4 В от настоящото приложение (6) или метод за изпитване в свободно пространство на Международната организация за стандартизация (ISO) (18), при което се използва предварително експониран инокулум от изпитването за симулиране. Ако е измерено както елиминирането на DOC, така и елиминирането на специфичния химикал, наличието на съществена разлика между процента на елиминиране (по-нисък за първото, отколкото за второто) показва наличието в изходящите води на междинни органични продукти, чието биоразграждане може да е по-трудно от това на химикала.

*Валидност на резултатите от изпитването*

63. Информация за обичайното поведение на инокула по отношение на биоразграждането може да се получи, ако се определи степента на биоразграждане на органичната среда (точка 53) в контролния модул. Изпитването се приема за валидно, ако степента на елиминиране на DOC и ХПК в контролния модул(и) е  $> 80\%$  след две седмици и не е наблюдавано нищо необичайно.
64. Ако е използван (референтен) химикал, който е лесно биоразградим, степента на биоразграждане ( $D_t$ , точка 52) трябва да бъде  $> 90\%$ .
65. Ако изпитването се провежда при условия на нитрификация, средната концентрация в изходящите води трябва да бъде  $< 1\text{ mg/l}$  азот от амоняк и  $< 2\text{ mg/l}$  азот от нитрити.
66. ако не са изпълнени тези критерии (точки 63—65), изпитването се повтаря, като се използва инокулум от друг източник, изпитва се референтен химикал, и се преразглеждат всички експериментални процедури.

**Доклад от изпитването**

67. В доклада от изпитването се включва следното:

*Изпитван химикал:*

- данни за идентифициране на химикала,
- физична природа и, където е подходящо, физични и химични свойства.

*Условия на изпитването:*

- тип на изпитвателната система; всякакви изменения във връзка с изпитване на неразтворими и летливи химикали,
- тип органична среда,
- ако са известни, съотношение и естество на промишлените отпадъчни води в отпадъчните води,
- инокулум, естество и място(места) на пробовземане, концентрация и предварително третиране,
- изходен разтвор на изпитвания химикал: съдържание на DOC и ХПК; ако се касае за суспензия — как е приготвена; концентрация, използвана в изпитването; причини, ако DOC е извън обхвата  $10\text{—}20\text{ mg/l}$ ; метод на добавяне; дата на първото добавяне; промени,
- средна възраст на утайката и средно време на задръжане на течността; метод за изразходване на утайката; методи за преодоляване на набъбването на утайката, загубите на утайка и т.н.,
- използвани аналитични методи,
- температура, при която се провежда изпитването,
- характеристики на набъбналата утайка, обмен индекс на утайката (ОИУ), твърди вещества, суспендирани в смесената течност (ТВССТ),
- всякакви отклонения от стандартните процедури и всякакви обстоятелства, които могат да окажат влияние на резултатите.

*Резултати от изпитването:*

- всички данни от измервания (DOC, ХПК, специфични анализи, рН, температура, концентрация на кислород, суспендирани твърди вещества, и азотсъдържащи химикали, ако е подходящо,
- всички изчислени стойности на  $D_t$  (или  $D_{10}$ ),  $D_B$ ,  $D_{St}$ , представени в таблична форма, и графиките на елиминирането,
- информация за латентната фаза и за фазата на плато, продължителността на изпитването, степента на елиминиране на изпитвания химикал и тази на органичната среда в контролния модул, а също и статистическа информация и декларации за биоразградимост и валидност на изпитването,
- обсъждане на резултатите.

## ПРЕПРАТКИ:

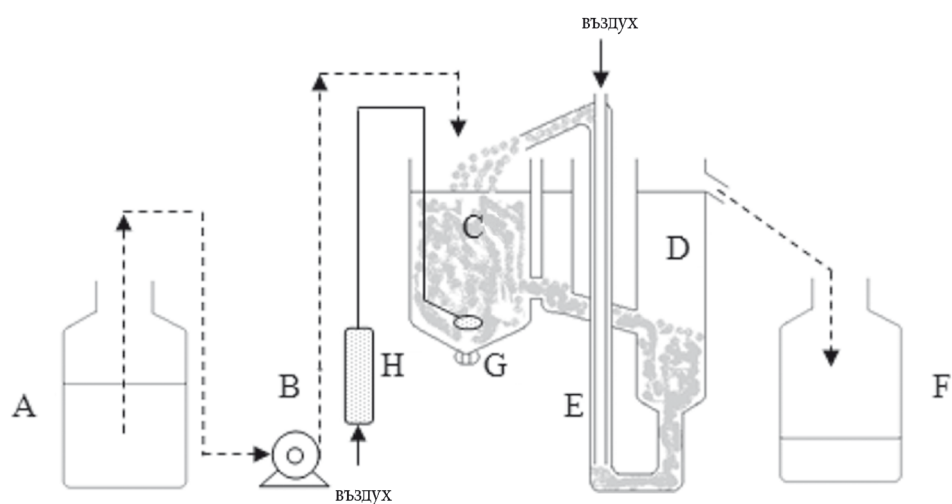
- (1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation“, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
  - (2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 № 49: 698-706.
  - (3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report № 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
  - (4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.
  - (5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
  - (6) Глава В.4 от настоящото приложение, Определяне на пряката биологична разградимост.
  - (7) Глава В.12 от настоящото приложение, Биологично разграждане — модифицирано SCAS изпитване.
  - (8) Глава В.19 от настоящото приложение, Изчисляване коефициента на адсорбция ( $K_{oc}$ ) на почвата и на утайката от отпадни води с използване на високоефективна течна хроматография (HPLC).
  - (9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.
  - (10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
  - (11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
  - (12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.
  - (13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
  - (14) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
  - (15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.
  - (16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
  - (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.
  - (18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.
-

## Допълнение 1

Фигура 1

## Оборудване, използвано за оценка на биоразградимостта

Модул на Husmann

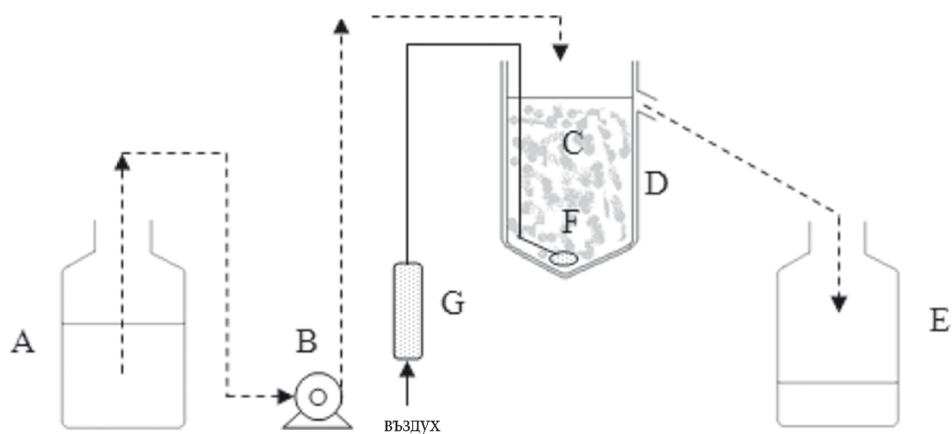


- |                                       |                           |
|---------------------------------------|---------------------------|
| A Съд за съхранение                   | E Въздушна (ерлифт) помпа |
| B Дозираща помпа                      | F Съд за събиране         |
| C Камера за аериране (с капацитет 3l) | G Аератор                 |
| D Утайтел                             | H Дебитомер за въздух     |

Фигура 2

## Оборудване, използвано за оценка на биологичната разградимост

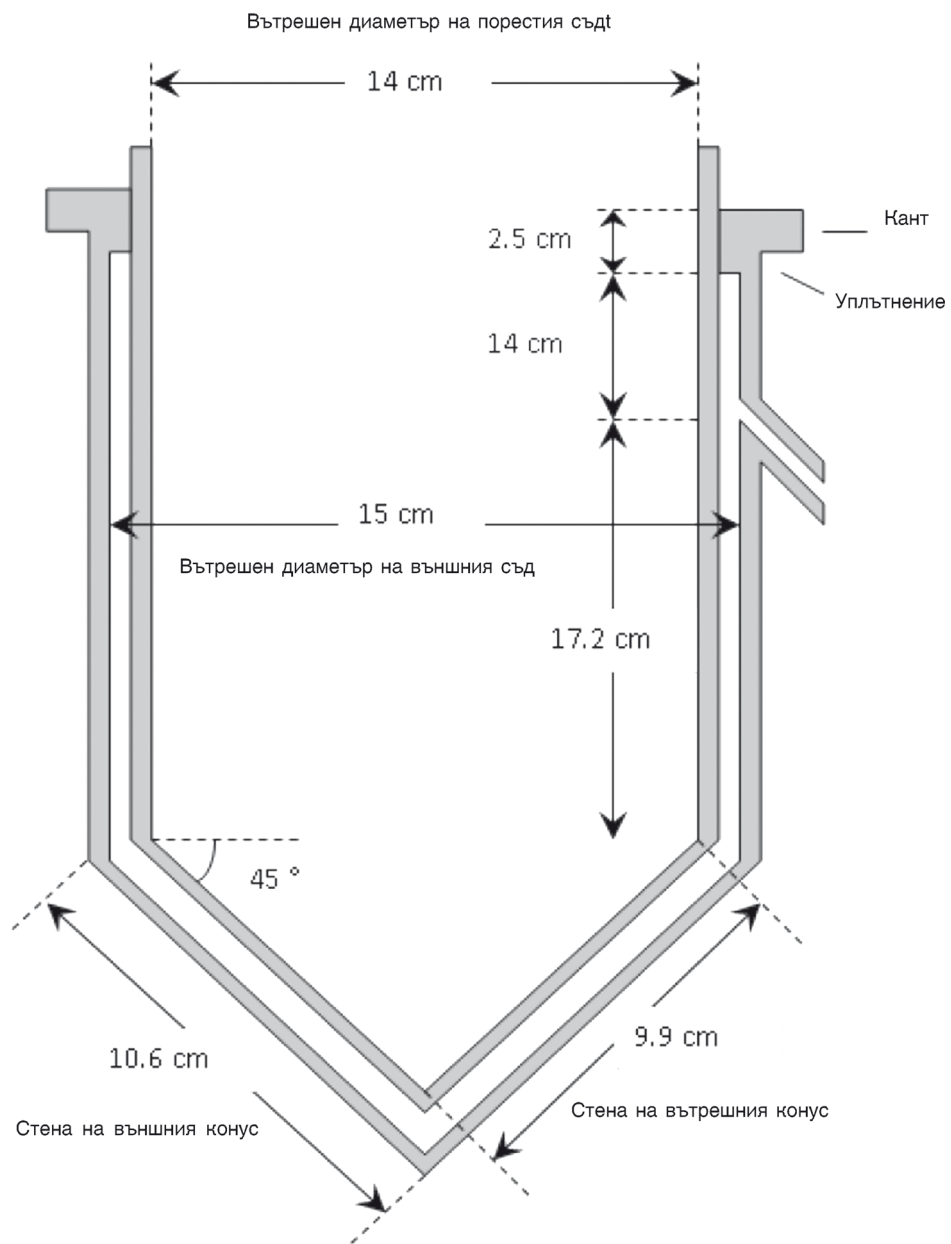
Порест съд



- |                           |                       |
|---------------------------|-----------------------|
| A. Съд за съхранение      | E Съд за събиране     |
| B. Дозираща помпа         | F Дифузор             |
| C. Порест съд за аериране | H Дебитомер за въздух |
| D. Външен непроницаем съд |                       |

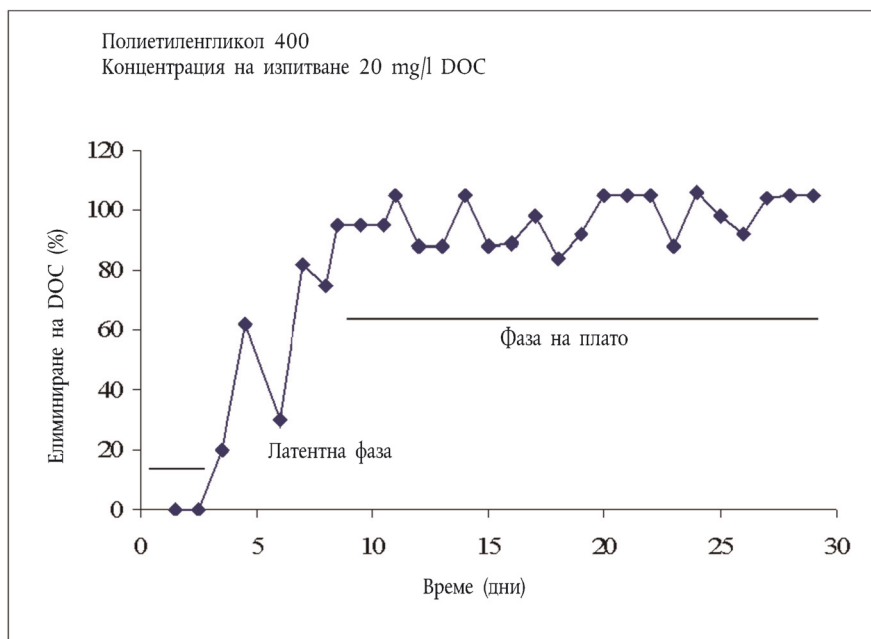
Фигура 3

## Подробности за трилитровия съд за аериране с порест съд



## Допълнение 2

## Пример на крива на елиминиране



## Допълнение 3

[ТЕКСТ ЗА ИНФОРМАЦИЯ]

## СВЪРЗВАНЕ НА ИЗПИТВАТЕЛНИТЕ МОДУЛИ

За да се уеднакви микробната популация на активната утайка в изпитвателния модул, в който се добавят отпадъчни води и изпитваният химикал, с тази на контролния модул, в които се добавят само отпадъчни води, се предприема ежедневен обмен на утайка (1). Процедурата се нарича „свързване“, а методът е известен като „свързани модули“. Свързването първоначално е било извършено с използване на модули с активна утайка на Husmann, но е било приложено и при модулите с порест съд (2)(3). Не са наблюдавани значими разлики в резултатите съответно на свързаните и на несвързаните модули, независимо дали става дума за модули на Husmann или модули с порест съд, така че няма полза от губенето на времето и енергията, необходими за свързване на модулите.

Обменът на утайка може да създаде погрешна представа, че е налице значително елиминиране, тъй като част от изпитвания химикал се пренася и концентрацията му в изпитвателния модул почти се изравнява с тази в контролния. Поради това трябва да се използват корекционни коефициенти, които се определят в зависимост от частта на обменената активна утайка и от средното време на задържане на течността. Публикувана е подробна допълнителна информация за начина на изчисляване (1).

Като се използва общата формула се пресмятат коригираните стойности на елиминиране на DOC и ХПК.

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12) \%$$

където

$D_{tc}$  = коригираният процент на елиминиране на DOC или ХПК

$D_t$  = определеният процент на елиминиране на DOC или ХПК

$a$  = обменената част от обема на модулите с активна утайка

$r$  = средно време на задържане на течността (часове)

Ако например е обменена половината от обема на резервоара за аериране ( $a = 0,5$ ) и средното време на задържане на течността е 6 часа, формулата за коригиране е:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

## ПРЕПРАТКИ

- (1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.
- (2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.



## Допълнение 4

## ОЦЕНКА НА ИНХИБИРАНЕТО НА АКТИВНАТА УТАЙКА

**Инхибиране, причинено от изпитваните химикали**

1. Възможно е химикал (или отпадъчни води) да не бъде разграден или елиминиран при изпитването за симулиране, или дори химикалът да има инхибиращо въздействие върху микроорганизмите на активната утайка. Други химикали претърпяват биоразграждане при ниски концентрации, но оказват инхибиращо въздействие при по-високи концентрации (хормезис). Инхибиращото въздействие може да се е проявило на по-ранен стадий или може да се определи, като се проведе изпитване за токсичност, като се използва инокулум, подобен на използвания при изпитването за симулиране, или еднакъв с него (1). Такива методи са инхибирането на поемането на кислород (глава В.11 от настоящото приложение (2) и ISO 8192(3) или инхибиране на растежа на организмите на утайката (ISO 15522 (4)).
2. При изпитването за симулиране инхибирането ще се прояви чрез това, че по отношение на разтворения органичен въглерод (DOC) или химично потребния кислород (ХПК) разликата между изходящите води от съда в изпитвателния модул и тези от контролния съд ще бъде по-голяма, отколкото DOC, добавен като изпитван химикал. Изразено по друг начин, процентът на елиминиране на DOC (и биохимично потребния кислород БПК, химично потребния кислород ХПК и/или  $\text{NH}_4^+$ ) на органичната среда, подложена на преработка, ще намалее при наличието на изпитвания химикал. Ако това се случи, изпитването се повтаря, като се намалява концентрацията на изпитвания химикал, докато се достигне ниво, при което не се наблюдава инхибиране и евентуално се продължава намаляването на концентрацията, докато изпитваният химикал не се биоразгради. Ако обаче изпитваният химикал (или отпадъчните води) имат неблагоприятно въздействие върху процеса при всички концентрации на изпитване, това е указание, че биологичната обработка на химикала е трудна, ако не и невъзможна, но че може да е оправдано изпитването да се повтори с активна утайка от друг източник и/или активната утайка да се подложи на по-постепенно аклиматизиране.
3. Обратно, ако изпитваният химикал претърпи биоелиминиране при първия опит в изпитването за симулиране, концентрацията му трябва да бъде увеличена, ако е необходимо да се знае дали химикалът може да има инхибиращо въздействие.
4. При опитите за определяне на степента на инхибиране, трябва да се помни, че микробната популация на активната утайка може да се промени, така че с времето микроорганизмите могат да развият толерантност към химикал с инхибиращо въздействие.
5. Изчисляване на степента на инхибиране:

Общият процент на елиминиране  $R_o$  на БПК, DOC, ХПК и т.н. за изпитвателния и за контролния модул може да се изчисли с помощта на уравнението:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

където:

I = концентрация на БПК, DOC, ХПК и т.н. във входящи води на изпитвателния или контролния модул (mg/l)

E = съответната концентрация в изходящи води (mg/l).

I и E трябва да се коригират по отношение на стойността на DOC, поради изпитвания химикал в изпитвателните модули, защото в противен случай изчисленията на процента на инхибиране ще бъдат неверни.

Степента на инхибиране, дължаща се на наличието на изпитвания химикал, може да се изчисли чрез уравнението:

$$\% \text{ инхибиране} = 100 (R_c - R_t)/R_c$$

където:

$R_c$  = процент на елиминиране в съдовете на контролния модул

$R_t$  = процент на елиминиране в съдовете на изпитвателния модул

**ПРЕПРАТКИ**

- (1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.
- (2) Глава В.11 от настоящото приложение, Биологично разграждане – изпитване за потискане дишането на активирана утайка.
- (3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- (4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

## Допълнение 5

**Малко разтворими във вода химикали — летливи химикали****Малко разтворими във вода химикали**

Вероятно не са публикувани много доклади за подлагане на малко разтворими във вода и неразтворими химикали на изпитвания за симулиране на обработка на отпадъчни води (1)(2)(3).

Няма единствен метод за диспергиране на изпитвания химикал, който да се прилага за всички неразтворими химикали. Два от четирите типа методи, описани в ISO 10634 (4), могат да се окажат подходящи при опитите за диспергиране на изпитваните химикали за изпитване за симулиране; това са използването на емулгатори и/или ултразвук. Трябва да се определи стабилността на получената дисперсия за период от най-малко 24 часа. В резервоара за аериране отделно от битовите (или синтетичните) отпадъчни води се дозират стабилизиращи по подходящ начин дисперсии, съхранявани в резервоар с непрекъснато разбъркване (точка 38).

Ако дисперсиите са стабилни, трябва да се проучи как може да бъде определен изпитваният химикал, когато е под формата на дисперсия. Малко вероятно е подходящият метод да бъде определянето на DOC, така че трябва да се намери специфичен за изпитвания химикал аналитичен метод, който да бъде приложен към изходящите води, твърдите вещества в тях, както и за активната утайка. В този случай трансформацията на изпитвания химикал при изпитване за симулиране на процеса с активна утайка се определя за течната и твърдата фаза. Поради това се определя масов баланс, за да се реши дали изпитваният химикал е претърпял биоразграждане. По този начин обаче се определя само първичното биоразграждане. Трябва да се направи опит за определяне на крайното биоразграждане, като се извърши изпитване за лесна биоразградимост с помощта на респирометър (глава В.4 от настоящото приложение (5) В, Е или Г), като се използва инокулум от утайка, изложена на изпитвания химикал в изпитването за симулиране.

**Летливи химикали**

Прилагането на изпитвания за симулиране на третирането на отпадъчните води към летливите химикали е както спорно, така и проблемно. Както и за малко разтворимите изпитвани химикали, публикувани са много малко доклади, които описват изпитвания за симулиране, при които се използват летливи химикали. Чрез херметично затваряне на резервоара за аериране и утайтеля се приспособява конвенционален апарат с пълно смесване, с помощта на дебитометри се измерва и контролира потокът въздух, а изходящите газове се прекарват през уловители, за да се съберат летливите органични вещества. В някои случаи се използва вакуумна помпа, за да се отведе изходящият газ през уловител за пари, съдържащ Терах и силикагел, с цел провеждане на газово-хроматографски анализи. Изпитваният химикал, наличен в уловителя, може да бъде определен аналитично.

Изпитването се провежда в две части. Първоначално модулите функционират без утайка, но в резервоара за аериране се подават с помпа синтетичните отпадъчни води с изпитвания химикал. В продължение на няколко дни се събират и анализират за изпитвания химикал проби от входящите води, изходящите води и изходящия газ. От получените данни може да се изчисли процентът ( $R_{vs}$ ) на изпитвания химикал, изведен от системата.

След това се извършва обикновено биологично изпитване (с утайка) при условия, които са еднакви с тези при изпитването за извеждане. Правят се също и измервания на DOC и ХПК, за да се провери дали модулите работят ефективно. От време на време през първата част на изпитването се правят и анализи за определяне на изпитвания химикал във входящите и изходящите води, а също и в изходящия газ; след аклиматизиране на утайката анализите се правят по-често. Както и преди, въз основа на данните, получени във фазата на стабилизиране, може да се изчисли процентът на елиминиране на изпитвания химикал чрез всички процеси ( $R_T$ ) (физични и биологични) от течната фаза, както и делът ( $R_V$ ), изведен от системата.

Изчисление:

- а) При небиологично изпитване процентът ( $R_{VP}$ ) от изпитвания материал, изведен от системата, може да се изчисли с помощта на израза:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

където

$R_{VP}$  = елиминиране на изпитвания химикал, дължащо се на изпаряване (в %),

$S_{VP}$  = изпитван химикал, събран в уловителя, изразен като еквивалентна концентрация в течна фаза (mg/l),

$S_{IP}$  = концентрация на изпитвания химикал във входящите води (mg/l).

- б) При биологично изпитване процентът ( $R_V$ ) от изпитвания материал, изведен от системата, може да се изчисли с помощта на израза:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

където

$R_V$  = елиминиране на изпитвания химикал, дължащо се на изпаряване при биологичното изпитване (в %),

$S_V$  = изпитван химикал, събран в уловителя при биологично изпитване, изразен като еквивалентна концентрация във входящите води (mg/l),

$S_I$  = концентрация на изпитвания химикал във входящите води (mg/l).

в) В биологичните изпитвания процентът ( $R_T$ ) от изпитвания химикал, изведен чрез всички процеси, се дава от:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

където

$S_E$  = концентрация на изпитвания химикал в изходящите (течни) флуиди (mg/l).

г) Процентът ( $R_{BA}$ ) изведени чрез биоразграждане и адсорбция химикали може да се изчисли с помощта на израза:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Трябва да се проведат отделни изпитвания за определяне дали изпитваният химикал е адсорбиран; ако това е така, може да се направи допълнителна корекция.

д) Сравнението между дела на изпитвания химикал, изведен съответно от биологичните ( $R_v$ ) и небологичните ( $R_{vp}$ ) системи за изпитване, показва общото въздействие, което биологичната преработка е оказала върху емисиите на изпитвания химикал в атмосферата.

*Пример:* Бензен

Време на задържане на утайката = 4 дни

Синтетични отпадъчни води; време на задържане = 8 h

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ } \mu\text{g/l}$$

Следователно:

$$R_{VP} = 100 \%, R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ и } R_{BA} = 85 \%$$

Беше прието, че бензенът не се адсорбира от утайката.

#### ПРЕПРАТКИ

- (1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) 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.
- (5) Глава В.4 от настоящото приложение (Определяне на пряката биологична разградимост).

## Допълнение 6

**Въздействие на времето на задържане на утайката върху възможността за третиране на химикалите**

## УВОД

1. Описаният в основния текст метод беше разработен, за да се провери дали изпитваните химикали (онези, за които е известно, че са присъщо биоразградими, но не и пълно биоразградими), могат да бъдат биоразградени в границите, наложени в станциите за пречистване на отпадъчни води. Резултатите са изразени като процент на елиминирането и биоразграждането. Условието на работа на модулите с активна утайка и изборът на входящи води позволяват колебания в доста широки граници на концентрацията на изпитвания химикал в изходящите води. Изпитванията се провеждат само при една номинална концентрация на твърдите частици в утайката или една стойност на номиналното време на задържане на утайката (ВЗК), и описаните режими на изразходване на утайката могат да доведат до значителни колебания на ВЗК по време на изпитването в два последователни дни, но също и в рамките на един ден.
2. В този вариант (1)(2) ВЗК се поддържа в много по-тесни граници в рамките на всеки 24-часов период (както се прави в по-голям мащаб), което води до по-постоянна концентрация на изходящите води. Препоръчва се използването на битови отпадъчни води, тъй като с тях се получават по-постоянни и по-високи стойности на процента на елиминиране. Освен това, изследва се въздействието на много стойности на ВЗК, а в по-подробно изследване може да се определи въздействието на температурен обхват върху концентрацията на изходящите води.
3. Все още няма консенсус кои са работещите кинетични модели, когато химикалите претърпяват биоразграждане в условията на пречистване на отпадъчни води. Бе избрано (1) (2) върху събраните данни да се приложи моделът на Моно за бактериалния растеж и използването на субстрата, тъй като методът е предназначен да се използва само спрямо химикали, произвеждани в промишлени количества, които поради това присъстват в отпадъчните води с концентрация от над 1 mg/l. Валидността на опростения модел и направените допускания беше определена с помощта на етоксилати на алкохоли, които имат различна степен на първична биоразградимост (2) (3).

*Забележка:* Настоящият вариант в голяма степен повтаря текста, описващ настоящия метод за изпитване В.10-А, и само подробностите, които са различни, са посочени по-долу.

## ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

4. Модулите с активна утайка с порест съд, разработени за улесняване на (почти) непрекъснатото изразходване на смесената течност, позволяващо много точен контрол на времето на задържане на утайката (ВЗК, или  $\theta$ ), се поставят да функционират в режим на несвързани модули при набор от стойности на ВЗК, и по избор — при набор от стойности на температурата. Времето на задържане на утайката е обикновено между 2 и 10 дни, а температурата — между 5 и 20 °C. Отпадъчни води, за предпочитане битови, и разтвор на изпитвания химикал се дозират поотделно в модулите с дебит, който да осигури изисканото време на задържане на утайката (3 до 6 часа) и изисканата концентрация на изпитвания химикал във входящите води. За сравнение успоредно се задействат контролните модули, в които не се добавя от изпитвания химикал.
5. Могат да се използват и други типове апарати, но трябва особено да се внимава да се осигури точен контрол на ВЗК. Например, когато се използват станции, снабдени с утайтел, може да е необходимо да се държи сметка за загубата на твърди вещества с изходящите води. Освен това, трябва да се вземат и специални предпазни мерки да се избягват грешки поради колебанията на количеството утайка в утайтеля.
6. Модулите се оставят да функционират при всеки от избраните набори условия и след достигане на равновесие в продължение на три седмици се вземат средните стойности на концентрацията в изходящите води на изпитвания химикал, и по избор, на DOC. Освен оценка на процента на елиминиране на изпитвания химикал и, по избор, на DOC, в графична форма се изразява и зависимостта между условията на функциониране на станцията и концентрацията в изходящите води. Въз основана тази информация може да се пресметнат опитни кинетични константи и да се предскажат условията, при които може да се третира изпитваният химикал.

## ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

7. Прилага се глава В.10-А, точки 12 и 13.

## ПРАГОВИ НИВА

8. Прилага се глава В.10-А, точки 14 и 15.

## РЕФЕРЕНТЕН ИЗПИТВАН ХИМИКАЛ

9. Прилага се глава В.10-А, точка 16.

## ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНИЯТА

10. Прилага се глава В.10-А, точки 17 и 18.

## ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

**Апаратура**

11. Подходящ модул е изменената система с порест съд (допълнение 6.1). Той се състои от вътрешен съд (или облицовка), изработен от порест полипропилен с дебелина 3,2 mm и размер на порите приблизително 90 µm и дебелина 2 mm, с челно заварен шев. (Така се получава модул, който е по-здрав от описания в точка 21 от настоящата глава В.10-А). Порестият съд е монтиран в непропусклив външен съд от полиетилен, състоящ се от две части: кръгла основа, в която са пробити отвори, през които минават две тръби за въздух и тръба за отвеждане на изразходваната утайка, и горен цилиндър, завинтен върху основата, който има изходен отвор, разположен така, че да налива известен обем (3 l) в контейнера на порестия съд, една от тръбите за въздух е снабдена с дифузор от порест камък, а другата е отворена и обърната под прав ъгъл към камъка в съда. Тази система предизвиква достатъчно турбулентност, така че да се гарантира, че съдържанието на съда е напълно размесено, а също осигурява по-висока от 2 mg/l концентрация на разтворения кислород.
12. Подходящият брой модули се поддържат при контролирана температура в интервала 5—20 °C ( $\pm 1$  °C) във водна баня или в помещения с постоянна температура. Необходими са помпи, които да дозират разтвора на изпитвания химикал и утаените отпадъчни води при изисквания дебит (съответно 0—0,1 ml/min и 0-25 ml/min), както и трета помпа, която да изпомпва изразходваната утайка от съдовете за аериране. Необходимият много слаб дебит на изразходваната утайка се постига с използване на помпа, която работи при по-висок дебит, и се включва периодично с помощта на таймер-превключвател, например като работи 10 секунди на минута с дебит от 3 ml/min, помпата осигурява дебит на изразходваната утайка от 0,5 ml/min.

*Апарат за филтруване или центрофуга*

13. Прилага се глава В.10-А, точка 23.

*Аналитично оборудване*

14. Прилага се глава В.10-А, точка 24.

*Води*

15. Прилага се глава В.10-А, точки 25 и 26.

*Органична среда*

16. Прилага се глава В.10-А, точка 27.

*Синтетични отпадъчни води*

17. Прилага се глава В.10-А, точка 28.

*Битови отпадъчни води*

18. Прилага се глава В.10-А, точка 29.

*Активна утайка*

19. Прилага се глава В.10-А, точка 30.

*Изходни разтвори на изпитвани вещества*

20. Прилага се глава В.10-А, точки 31 и 32.

## ПРОЦЕДУРА

*Приготвяне на инокулум*

21. Прилага се само глава В.10-А, точка 34 — използва се само активна утайка (около 2,5 g/l).

*Брой изпитвателни модули*

22. За обикновено изпитване, т.е., такова, с което се цели да се определи процентът на елиминиране, е достатъчно определянето на едно ВЗК, но за да съберат данни за изчисляване на опитни кинетични константи, са необходими 4 или 5 стойности на ВЗК. Обикновено се избират стойности между 2 и 10 дни. На практика подходящо е да се извършва изпитване, като едновременно се приложат 4 или 5 стойности на ВЗК при една и съща температура; в по-разширени изследвания се използват същите стойности на ВЗК, като са възможни и стойности от друг обхват, при

други температури в обхвата 5—20 °C. За първичното биоразграждане (основно използване) обикновено се изисква само един модул за набор от условия. За определяне обаче на крайното биоразграждане, за всяка комбинация от условия се изисква контролен модул, зареждан с отпадъчни води, но не и с изпитвания химикал. Ако се смята, че изпитваният химикал е наличен в използваните отпадъчни води, необходимо е да се използва контролен модул при определянето на първичното биоразграждане, както и да се направят необходимите корекции в изчисленията.

#### *Добавяне на органичната среда и изпитвания химикал*

23. Прилага се глава В.10-А, точки 36—39, но е важно да се подчертае, че разтворът на изпитвания химикал се дозира отделно и че се използват различни скорости на изразходване на утайката. Често, т.е. два пъти на ден, се проверява дебитът на входящите води, изходящите води и изразходването на утайка и, ако е необходимо, се коригира с оглед колебания в рамките на  $\pm 10\%$ . Ако при използване на битови отпадъчни води се появяват трудности по отношение на аналитичните методи, изпитването се провежда със синтетични отпадъчни води, но трябва да се вземат мерки различните среди да дават съпоставими резултати по отношение на кинетиката.

#### *Работа с модулите с активна утайка*

24. Прилага се глава В.10-А, точки 40—43, но ВЗК се контролира само чрез „постоянно“ изразходване на утайката.

#### *Проби и анализ*

25. Прилага се глава В.10-А, точки 44—50, с изключение на това, че трябва да се определи концентрацията на изпитваните химикали, а определянето на DOC е по избор. Не се използва ХПК.

#### ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

##### **Обработка на резултатите**

26. Прилага се глава В.10-А, точки 52—54.

##### **Изразяване на резултатите от изпитването**

27. Прилага се глава В.10-А, точки 56—62.

##### **Изчисляване на кинетични константи**

28. По-реалистично е да се посочи средната концентрация на изпитвания химикал в изходящите води при постигнато стационарно състояние и да се опише как тя се променя в зависимост от условията на работа на съоръженията, отколкото да се посочи процентът на първично биоразграждане. За целта се използва уравнение (6) в допълнение 6.2, от което се получават стойностите на  $K_S$ ,  $\mu_m$  и  $\theta_{SC}$  — критичното време на задържане на утайката.

(Като алтернатива, приблизителните стойности на  $K_S$  и  $\mu_m$  могат да се получат с използване на проста компютърна програма, която нагажда теоретичната крива, изчислена с помощта на уравнение 2 (допълнение 6.2), към получените експериментални данни. Въпреки че никое получено решение не е единствено възможното, може да се получи разумно приближение за  $K_S$  и  $\mu_m$ .)

##### **Вариране на резултатите**

29. Често за един и същ химикал се получават променливи стойности за кинетичните параметри. Смята се, че условията, при които е протекъл растежът на утайката, както и условията, в които е проведено изпитването (както в точка 5 и в други изпитвания), имат силно влияние върху получаваните резултати. Един от аспектите на посоченото вариране е разгледан от Grady et al (4), които предложиха термините „действителен“ и „присъщ“ да се използват за двете крайни условия, представляващи границите на физиологичните състояния, които дадена култура може да приеме по време на експеримент за определяне на кинетиката. Ако състоянието не може да се променя по време на експеримента, стойностите на кинетичните параметри отразяват условията в средата, от която са взети микроорганизмите. Такава стойности се наричат „действителни“ или съществуващи към дадения момент. Обратно, ако условията на изпитването позволяват цялостно развитие на системата за синтез на белтък, която позволява максимално възможната скорост на растеж, получените кинетични параметри се наричат „присъщи“, и зависят само от естеството на субстрата и от типовете на бактериите в културата. Като насока, действителните стойности се получават като съотношението на концентрацията на субстрата към разграждащите микроорганизми ( $S_0/X_0$ ) се поддържа ниско, напр. 0,025, а присъщите стойности се появяват, когато съотношението е високо, напр. най-малко 20. И в двата случая  $S_0$  трябва да е равна на съответната стойност на константата на полунасищане  $K_S$  или да е по-висока от нея.

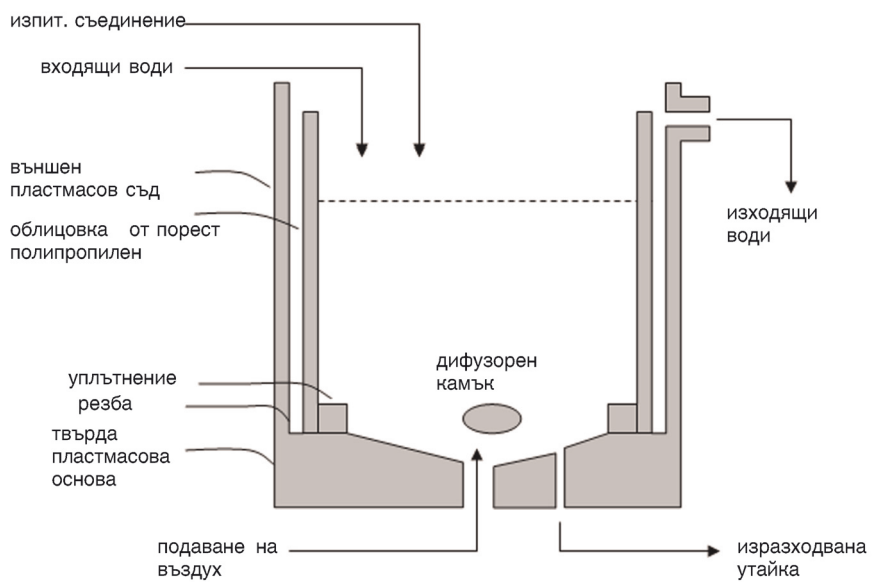
30. Варирането на резултатите и други аспекти на кинетиката на биоразграждането бяха обсъдени неотдавна на работна среща на SETAC (5). Посочените изследвания, публикувани или в стадий на проект, имат потенциала да доведат до ясно разбиране на кинетиката на реакциите, протичащи в станциите за пречистване на отпадъчни води, да позволят наличните данни да бъдат тълкувани по-задълбочено, а също и да дадат идеи за по-нататъшно развитие на методите на изпитване.

*ПРЕПРАТКИ:*

- (1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.
  - (2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.
  - (3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.
  - (4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.
  - (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.
-

## Допълнение 6.1

## Порест съд с контрол на ВЗК





## Допълнение 6.2

## Изчисляване на кинетични константи

1. Като се допусне, че е приложим кинетичният модел на Моно и като се разгледа масовият баланс на активните твърди вещества и на субстрата в системата с активна утайка (1), за постигане на стационарно състояние се получават следните изрази:

$$\frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

или

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

където

$S_1$  = концентрация на субстрата в изходящите води (mg/l).

$K_s$  = константата на полунасищане, концентрацията, при която  $\mu = \mu_m/2$  (mg/l)

$\mu$  = специфична скорост на растеж ( $d^{-1}$ )

$\mu_m$  = максимална стойност на  $\mu_m$  ( $d^{-1}$ )

$K_d$  = специфична скорост на разграждане на активните твърди вещества ( $d^{-1}$ )

$\vartheta_s$  = средно време на задържане на утайката (d)

Разглеждането на това уравнение води до следните заключения:

- i) Концентрацията на изходящите води е независима от тази на входящите води ( $S_0$ ); така, процентът на биоразграждане се изменя в зависимост от концентрацията на входящите води ( $S_0$ ).
- ii) Единственият параметър за контрол на пречиствателната станция, който влияе на  $S_1$ , е времето на задържане на утайката  $\vartheta_s$ .
- iii) За дадена концентрация  $S_0$  на входящите води има критично време на задържане на утайката, такова че:

$$\frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

където

$\vartheta_{SC}$  = критично време на задържане на утайката, под което разграждащите микроорганизми ще бъдат отмити от станцията.

- iv) Тъй като другите параметри в уравнение (2) са свързани с кинетиката на растежа, очаква се температурата да влияе на концентрацията на субстрат в изходящите води и определящата възраст на утайката, т.е., времето на задържане на утайката, необходимо за получаване на определена степен на преработка, ще се увеличи при намаляване на температурата.

2. Като се изхожда от тепловния баланс на твърдите вещества в системата с порест съд, и като се допусне, че концентрацията  $X_2$  на твърдите вещества в изходящите води на станцията е ниска в сравнение с тази в съда за аериране  $X_1$ , времето на задържане на утайката

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

и

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

където

$V$  = обем на съда за аериране (l)

$X_1$  = концентрация на твърди вещества в съда за аериране (mg/l).

$X_2$  = концентрация на твърди вещества в изходящите води (mg/l)

$Q_0$  = дебит на входящите води (l/d)

$Q_1$  = дебит на изразходваната утайка (l/d)

Поради това е възможно да се контролира времето на задържане на утайката и то да се поддържа на предварително определена стойност чрез контрол на дебита на изразходвана утайка  $Q_1$ .

#### Заклучения

- Основната цел на изпитването е следователно да се направи възможно да се предсказва концентрацията на изходящите води, а чрез нея и нивата на изпитвания химикал в приемащите води.
- Като се нанесат стойностите на  $S_1$  в зависимост от  $\vartheta_s$ , в редица случаи може бързо да се оцени критичното време на задържане на утайката  $\vartheta_{SC}$ , напр. крива 3 на фигура 1. Когато това не е възможно,  $\vartheta_{SC}$  може да се изчисли, както и приблизителните стойности на  $\mu_m$  и  $K_s$ , като се нанесат стойностите на  $S_1$ , в зависимост от  $S_1 \cdot \vartheta_s$ .

Новата формулировка на уравнение [1] дава:

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

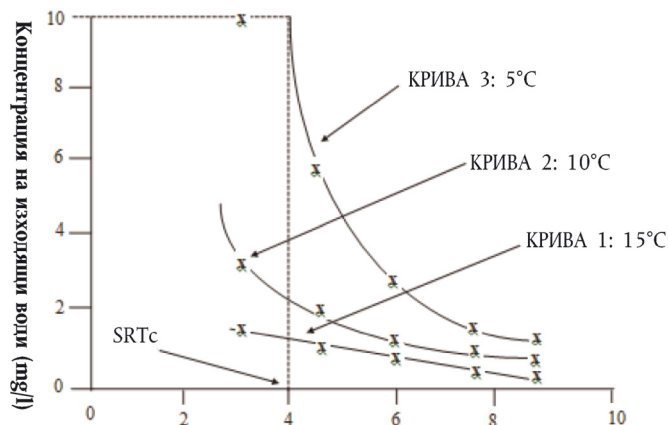
Ако  $K_d$  е малко,  $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$  и [5] приема вида:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

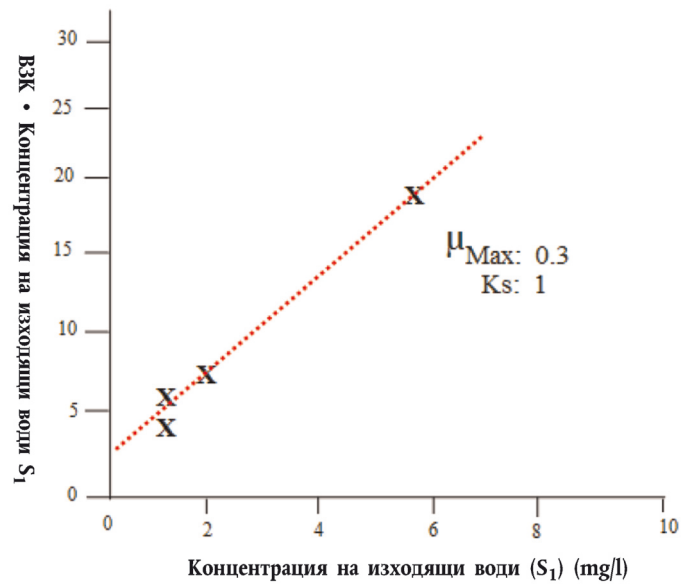
По този начин графиката трябва да е права линия (вж. фигура 2) с наклон  $1/\mu_m$  и да пресича  $K_s/\mu_m$ ; а също  $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$ .

Фигура 1

Три температури; пет ВЗК



Фигура 2

Регресионна линия на ВЗК •  $S_1$  по отношение на  $S_1$  при  $T = 5^\circ\text{C}$ 

Речник:

Концентрация на изходящи води:

Крива:

—

## Допълнение 7

ИЗПИТВАНЕ ПРИ НИСКА ( $\mu\text{g/l}$ ) КОНЦЕНТРАЦИЯ

1. Нормалното съдържание на много химикали във водна среда, дори в отпадъчните води, е много ниско ( $\mu\text{g/l}$ ). При такава концентрация те най-вероятно не служат за първични субстрати, които предизвикват растеж, и може да се предположи по-скоро, че те се разграждат като непредизвикващи растеж вторични субстрати, наред с други естествени химикали, съдържащи въглерод. Следователно, разграждането на подобни химикали не протича според модела, описан в допълнение 6. Съществуват много модели, които биха могли да се приложат, и при условията на функциониране на системите за преработка на отпадъчни води е възможно едновременно да функционират два и повече модели. За изясняване на проблема са необходими много по-задълбочени изследвания.
2. Междувременно може да се следва процедурата, описана в основния текст (глава В.10-А), но само що се касае до първичната биоразградимост, като се използват подходящо ниски концентрации ( $< 100 \mu\text{g/l}$ ) и валидирана аналитична процедура. Процентът на биоразграждане може да се пресметне (вж. точка 54 от метода за изпитване), при условие че се отчетат абиотичните процеси (адсорбция, летливост и т.н.). Пример за такова пресмятане е изследването на Nyholm и неговите сътрудници (1) (2), при което е използван цикъл с продължителност 4 часа в система с пълнене и изпомпване. Те съобщават за константи от псевдо-първи порядък за 5 химикала, добавени към синтетични отпадъчни води в концентрация от 5 до  $100 \mu\text{g/l}$ . (за оценка на крайното биоразграждане могат да се използват белязани с  $^{14}\text{C}$  химикали за изпитване. Описанието на подобен метод излиза извън обхвата на настоящия метод за изпитване, тъй като все още няма приети процедури, въпреки че съществува метод, предложен за ISO 14592 (3), който съдържа насоки за използването на химикали, белязани с  $^{14}\text{C}$ ).

## Полунепрекъснато изпитване с активна утайка

3. По-късно беше предложено по-просто изпитване от два етапа; след метода на полунепрекъснатото изпитване с активна утайка (ПИАУ) се прилагат краткосрочни кинетични изпитвания върху проби, взети от модулите за провеждане на ПИАУ. Системата ПИАУ работи с известна скорост на изразходване на утайката (за разлика от оригиналния метод В.12) и се захранва с изменени синтетични отпадъчни води по рецептурата на ОИСП или с битови отпадъчни води. Синтетичните отпадъчни води са с променен състав (поради променящата се стойност на рН и лошата утаймост на утайката) чрез добавяне на фосфат в качеството на буфер, екстракт от мая, железен(III) хлорид и соли на микроелементи, а техният ДОС е увеличен на около  $750 \text{ mg/l}$  чрез увеличаване на концентрацията на пептон и месен екстракт. Модулите функционират с 24-часов цикъл: аериране 23 часа, изваждане на утайката, утаяване, изпомпване на супернатанта (изхолящите води), след което следва добавяне на синтетични отпадъчни води и изпитван химикал до концентрация  $100 \mu\text{g/l}$  (т.е. приблизително до същата концентрация, която се използва в краткосрочното изпитване). веднъж седмично 10 % от общото количество утайка се заменя с прясна утайка с цел поддържане на балансирана микробна популация.
4. В началото и в края на аерирането се измерва концентрацията на изпитвания химикал и изпитването продължава, докато се постигне окончателно елиминиране на изпитвания химикал; процесът продължава от една седмица до няколко месеца.

## Краткосрочно изпитване

5. Извършва се кратко изпитване (напр. 8 часа) с цел определяне на скоростната константа от (псевдо)първи порядък на разграждането на изпитвания химикал в активна утайка с известни, но различни произход и история. По-специално, пробите активна утайка са взети от реакторите за ПИАУ — след края на периода на аериране, когато концентрация на органичен субстрат е ниска — по време на експеримента за аклиматизиране (точки 3 и 4). Кал може да се вземе и от едновременно действащ модул за ПИАУ, в който не е добавен изпитваният химикал. Смесите от утайка и изпитван химикал, добавени в две или повече концентрации в интервала  $1\text{—}50 \mu\text{g/l}$ , се аерират без да се добавят синтетични отпадъчни води или друг органичен субстрат. Изпитваният химикал, който остава разтворен, се определя на равни интервали, напр. на всеки час, в зависимост от разградимостта на химикала, в течение на период, не по-дълъг от 24 часа. Пробите се центрофугират преди, да се подложат на съответния анализ.

## Изчисления

6. Данните от модулите за ПИАУ се използват за пресмятане на процента на елиминиране на изпитвания химикал (точка 54) освен това, с помощта на долното уравнение може да се изчисли константата за средна скорост  $K_1$  (нормализирана по отношение на концентрация на твърди вещества в суспензия):

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

където

t = време на аериране (23 часа)

 $C_e$  = концентрация в края на аерирането ( $\mu\text{g/l}$ ) $C_i$  = концентрация в началото на аерирането ( $\mu\text{g/l}$ )

SS = концентрация на твърдите вещества в активна утайка.

7. При краткосрочното изпитване се начертава кривата на логаритъма на остатъчната концентрация (%) в зависимост от времето, а наклонът на началната част ( $10\text{—}50\%$  от разграждането) на кривата е еквивалентен на  $K_1$ , константата от (псевдо)първи порядък. Константата се нормализира по отношение на концентрацията на твърдите вещества в утайката, като се раздели наклонът на концентрацията на твърдите вещества в утайката. При докладването на резултата трябва да се включат и данни за началната концентрация на изпитвания химикал и твърдите вещества, времето на задържане на утайката, зареждането и източника на утайката, както и информация за предварителната експозиция (ако има такава) на изпитвания химикал.

**Вариране на резултатите**

8. Варирането на резултатите и други аспекти на кинетиката на биоразграждането бяха обсъдени неотдавна на работна среща на SETAC (7). Посочените изследвания, публикувани или в стадий на проект, имат потенциала да доведат до по-ясно разбиране на кинетиката на реакциите, протичащи в станциите за пречистване на отпадъчни води, да позволят наличните данни да бъдат тълкувани по-запълбочено, а също и да дадат идеи за по-нататъшно развитие на методите на изпитване.

**ПРЕПРАТКИ**

- (1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. *Biodegradability. Wat. Res.* 26: 339-353.
- (2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res.* 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.
- (4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.
- (5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, № 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6<sup>th</sup> Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

---

**В.10-Б: Биофилми****УВОД**

1. Изпитванията за симулиране обикновено се прилагат по отношение на химикали, които не са преминали пресяващите изпитвания за лесна биоразградимост (глава В.4 А до Е от настоящото приложение (9)), но които са преминали изпитванията за присъща биоразградимост. По изключение изпитвания за симулиране се прилагат също и за всеки химикал, за който се изисква повече информация, по-специално за произведени в големи количества химикали, като обикновено се прилага изпитване с активна утайка (В.10-А). При някои обстоятелства обаче се изисква специфична информация за поведението на даден химикал по отношение на методите за пречистване на отпадъчни води с помощта на биофилми, а по-точно капещи биофилтри, въртящи се биологични дискове, съоръжения с кипящ слой. За решаване на тази задача са създадени разнообразни устройства.
2. Gerike *et al.* (1) прибягват до големи капещи биофилтри в пилотен мащаб, които те използват в режим на свързани модули. Тези филтри заемат твърде много място и изискват относително големи обеми отпадъчни води или синтетични отпадъчни води. Truesdale *et al.* (2) описват по-малки филтри (1,83 m × 0,15 m в диаметър) които се запазват с естествени отпадъчни води, без съдържание на повърхностноактивни вещества, но за които все пак са необходими доста големи обеми. За развитието на „зрял“ биофилм са необходими не по-малко от 14 седмици, а след първото въвеждане на изпитваното повърхностноактивно вещество трябва да изминат още 4—8 седмици, докато настъпи аклиматизиране.
3. Baumann *et al.* (3) разработват много по-малък филтър, при който се използва предварително натопен в активна утайка полиестерен памук, който служи за инертна среда, поддържаща биофилма. Изпитваният химикал служи за единствен източник на въглерод, а биоразградимостта се оценява като се измерва DOC във входящите и в изходящите води, а също и CO<sub>2</sub> в изпускания от модула газ.
4. Gloyna *et al.* (4) използват доста по-различен подход и изобретяват въртящ се тръбовиден реактор. Върху вътрешната повърхност на въртяща се тръба, по известната ѝ повърхнина, те отглеждат биофилм, като пропускат входящите води от горната страна на тръбата, наклонена под малък ъгъл спрямо хоризонталата. Реакторът е използван за изучаване на биоразградимостта на повърхностноактивни вещества (5), както и за проучване на оптималната дебелина на биофилма и на дифузията през филма (6). Същите автори разработват допълнително реактора, като включват възможност за определяне на CO<sub>2</sub> в изпусканияте газове.

5. Въртящият се тръбовиден реактор е одобрен от Standing Committee of Analysts (Обединено кралство) като стандартен метод за оценка на биоразградимостта на химикалите (7) и на пригодността за обработка и токсичността на отпадъчните води (8). Описаният тук метод има предимства като простота, компактни размери, възпроизводимост и се нуждае от сравнително малък обем органична среда.

#### ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

6. Върху вътрешната повърхност на бавновъртяща се тръба смесени или поотделно се прилагат синтетични или битови отпадъчни води и изпитваният химикал. По нейната вътрешна повърхност се развива слой микроорганизми, подобни на онези, които са налични в средата, изграждаща биофилтрите. Условието на работа на реактора се избират така че да осигуряват адекватно елиминиране на органичните вещества, и, ако това се изисква, окисляване на амониевия йон.
7. Изходящите води от тръбата се събира и се оставя да се утаи и/или се филтрува, преди да бъде анализирана за разтворен органичен въглерод (DOC) и/или за изпитвания химикал с помощта на специфичен метод. За сравнение при същите условия се задействат също и контролните модули, в които не се добавя от изпитвания химикал. Приема се, че разликата в концентрацията на DOC в изходящите води от изпитвателния и от контролния модул се дължи на изпитвания химикал и неговите органични метаболити. Посочената разлика се сравнява с концентрацията на добавения изпитван химикал (като DOC) за да се изчисли елиминирането на изпитвания химикал.
8. Биоразграждането по принцип може да се разграничи от биоадсорбцията чрез внимателно разглеждане на кривата на елиминирането в зависимост от времето. Обикновено може да се получи потвърждение чрез извършване на изпитване за лесно биоразграждане (поемане на кислород или излъчване на въглероден диоксид), като се използва аклиматизиран инокулум, взет в края на изпитването от реакторите, в които е добавен изпитваният химикал.

#### ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

9. Следва да бъдат известни чистотата, разтворимостта във вода и характеристиките по отношение на летливостта и адсорбцията, за да се даде възможност за правилно тълкуване на резултатите.
10. Обикновено летливи и малко разтворими химикали не могат да се изпитват, освен ако не са взети специални предпазни мерки (вж. допълнение 5 към глава B.10-A). Следва да са известни също и химичната структура, или поне емпиричната формула, за да се изчисляват теоретичните стойности и/или да се проверяват измерените стойности на параметрите, например теоретично потребният кислород (ТПК), DOC.
11. Информацията за токсичността на изпитвания химикал за микроорганизми (вж. допълнение 4 към глава B.10-A) може да бъде особено полезна при избирането на подходящи концентрации за изпитване и може да бъде съществена за правилното тълкуване при ниски стойности на биологичното разграждане.

#### ПРАГОВИ НИВА

12. Първоначално за пускането даден химикал на пазара се изискваше първичното биоразграждане на повърхностно-активни вещества да достига 80 % или повече. Ако не е постигната стойността от 80 %, може да се приложи (потвърдително) изпитване за симулиране и повърхностноактивното вещество да се пусне на пазара, само ако повече от 90 % от конкретния химикал бъде елиминиран. По отношение на химикалите по принцип не става дума за нива на преминаване/непреминаване, а стойността в проценти на постигнатото елиминиране може да се използва в приблизителни изчисления на вероятната концентрация в околната среда, която да се използва в оценките на риска, който химикалите пораждат. В множество изследвания на чисти химикали процентът на елиминиране на DOC достига до > 90 % при над три четвърти, и > 80 % при над 90 % от химикалите, които са показали някаква значима степен на биоразградимост.

#### РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

13. За да се гарантира, че експерименталната процедура е правилно изпълнена, полезно понякога да се изпитват референтни химикали, чието поведение е известно. Сред тези химикали например са адипиновата киселина, 2-фенилфенолът, 1-нафтолът, дифеновата киселина и 1-нафтоената киселина.

#### ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

14. Относителното стандартно отклонение, определено от лаборатория в Обединеното кралство, възлизаше в рамките на изпитванията на 3,5 %, а между изпитванията — на 5 % (7).

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Апаратура

*Реактори с въртящи се тръби*

15. Апаратът (вж. фигури 1 и 2 в допълнение 8) се състои от набор от акрилни тръби с дължина 30,5 cm и вътрешен диаметър 5 cm, разположени върху гумирани колелца, обхванати от метална поддържаща рамка. Всяка тръба има външна изпатина с дебелина приблизително 0,5 cm, за да се задържа върху колелцата, вътрешната

повърхност е обработена с груба стоманена вълна и снабдена също с издатина от 0,5 cm в горния край, която да задържа течността. Тръбите са наклонени под ъгъл от около един градус към хоризонталата, за да се осигури необходимото време за контакт, когато изпитваната среда е налята в чиста тръба. Гумираните колелца се задвижват от бавновъртящ се двигател с регулируема скорост. Температурата на тръбите се контролира, като те се разполагат в помещение с постоянна температура.

16. Чрез разполагане на всяка тръба на реактора в запушена тръба с малко по-голям размер и осигуряване на херметичността на свързките, излизащият  $\text{CO}_2$  може да бъде събран в алкален разтвор за последващо измерване (6).
17. За всяка тръба в съд (A) за съхранение с обем 20 l се съдържа запас за 24 часа органична среда с добавен изпитван химикал, ако е приложимо (вж. фигура 2). Ако е необходимо, разтворът на изпитвания химикал може да се дозира отделно. Близко до дъното на всеки съд за съхранение се намира изходен отвор, свързан чрез тръбичка от подходящ материал, напр. от силиконова гума, през перисталтична помпа (B) към стъклена или акрилна подаваща тръба, която влиза на дълбочина 2—4 mm в горната (входна) част на наклонената тръба (C). Изходящата течност се оставя да капе от долния край на наклонената тръба и се събира в друг съд за съхранение (D). Изходящата течност се оставя да се утаи или се филтрува преди да бъде анализирана.

*Апарат за филтруване — центрофуга*

18. Устройство за филтруване на проби с мембранни филтри с подходящ размер на порите (номинален диаметър на отворите 0,45  $\mu\text{m}$ ), които адсорбират разтворимите органични химикали или освобождават органичен въглерод в минимална степен. Ако се използват филтри, които освобождават органичен въглерод, те грижливо се промиват с гореща вода, за да се отстрани подлежащият на отмиване органичен въглерод. Вместо това може да се използва центрофуга, с която да може да се постигне 40 000  $\text{m/sec}^2$ .
19. Аналитично оборудване за определяне на:

- DOC/общ органичен въглерод (ТОС), или химично потребен кислород (ХПК),
- конкретния химикал (HPLC, GC и т.н.) ако е необходимо,
- рН, температура, киселинност, алкалност,
- амониев йон, нитрити, нитрати, ако изпитванията се извършват при условия на нитрификация.

*Вода*

20. Чешмяна вода, съдържаща по-малко от 3 mg/l DOC.
21. Дестилирана или дейонизирана вода, съдържаща по-малко от 2 mg/l DOC.

*Органична среда*

22. Като органична среда може да се използват синтетични или битови отпадъчни води, или смес от тях. Беше доказано, че използването само на битови отпадъчни води често води до повишено елиминиране на DOC (в модули с активна утайка) и дори позволява елиминирането и биоразграждането на някои химикали, които не са биоразградими при използване на синтетични отпадъчни води по рецептурата на ОИСР. Поради това се препоръчва използването на битови отпадъчни води. Измерва се концентрацията на DOC (или ХПК) във всяка нова партида органична среда. Киселинността или алкалността на органичната среда следва да бъде известна. Средата може да наложи добавянето на подходящ буфер (натриев хидрогенкарбонат или калиев хидрогенфосфат), ако киселинността или алкалността е ниска, за да се поддържа рН от около  $7,5 \pm 0,5$  в реактора по време на изпитването. Количеството буфер и моментът на добавянето му се определят във всеки конкретен случай.

*Синтетични отпадъчни води*

23. В един литър чешмяна вода се разтварят: пептон, 160 mg месен екстракт, 110 mg; уреа, 30 mg; безводен калиев дихидрогенфосфат, ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 28 mg; натриев хлорид, ( $\text{NaCl}$ ), 7 mg; калиев хлорид дихидрат ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 4 mg; магнезиев сулфат хептахидрат,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg. Тези синтетични отпадъчни води по ОИСР са примерни; те осигуряват средна концентрация на DOC от около 100 mg/l. Вместо тях може да се използват води с друг състав с приблизително същата концентрация на DOC, които да са по-близко до битовите отпадъчни води. Посочените синтетични отпадъчни води могат да се приготвят с дестилирана вода в концентрирана форма и да се съхраняват при около 1 °C до една седмица. Когато е необходимо, те се разреждат с чешмяна вода. (Тази среда е незадоволителна, напр. концентрацията на азот е много висока, съдържанието на въглерод е относително ниско, но не е предложено нищо по-добро, освен да се добави още фосфат като буфер и допълнително количество пептон).

*Битови отпадъчни води*

24. Използват се прясно утаени отпадъчни води, събирани ежедневно от пречиствателни станции, приемащи предимно битови отпадъчни води. Те трябва да са събрани от преливника на първия утайтел или от водите, постъпващи за третиране в пречиствателна станция с активна утайка, и почти да не съдържат груби частици. Отпадъчните води може да се използват след съхранение в продължение на няколко дни при около 4 °C, ако се докаже, че стойността на DOC (или ХПК) не е намалала значително (т.е. с по-малко от 20 %) по време на съхранението. С цел да се ограничат смущенията в системата, стойността на DOC (или ХПК) на всяка нова партида следва да се коригира преди употреба до подходяща постоянна стойност, напр. чрез разреждане с чешмяна вода

*Смазочно масло*

25. За смазване на ролките на перисталтичната помпа може да се използва глицерин или маслиново масло, тъй като те са подходящи за използване с тръби от силиконова гума.

*Изходни разтвори на изпитвания химикал*

26. Приготвят се изходни разтвори с подходяща концентрация (напр. 1—5 g/l) на химикалите с добра разтворимост в дейонизирана вода или в минералната част на синтетичните отпадъчни води. За неразтворимите химикали вж. допълнение 5 в глава В.10-А. Настоящият метод не е подходящ за летливи химикали, ако не се направят изменения на реакторите с тръби (точка 16). Определя се DOC и TOC на изходния разтвор и се повтарят измерванията за всяка нова партида. Ако разликата между DOC и TOC е по-голяма от 20 %, се проверява разтворимостта във вода на изпитвания химикал. Сравнява се DOC или концентрацията на изпитвания химикал, измерена чрез специфичен анализ на изходния разтвор, с номиналната стойност, за да се установи дали добивът е достатъчно добър (обикновено може да се очаква добив > 90 %. Проверява се, по-специално за дисперсии, дали DOC може да се използва като параметър за анализ, или може да се използва само аналитична техника, специфична за изпитвания химикал. При дисперсии се изисква центрофугиране на пробите. За всяка нова партида чрез специфичен анализ се определят DOC, ХПК или изпитваният химикал.
27. Определя се pH на изходния разтвор. Получаването на екстремни стойности означава, че добавянето на химикала може да повлияе на pH на активната утайка в системата за изпитване. В този случай с малки количества неорганична киселина или основа се неутрализира стандартният разтвор до получаване на pH, равно на  $7 \pm 0,5$ , като се избягва утаяване на изпитвания химикал.

## ПРОЦЕДУРА

*Подготвяне на органичната среда за добавяне*

28. Контейнерите за входящите и за изходящите води, а също и тръбите от едните към другите, старателно се почистват, за да се предотврати микробен растеж в началото на изпитването и по време на самото изпитване.
29. Синтетичните отпадъчни води (точка 23) се приготвят всеки ден или от твърдите вещества, или с подходящо разреждане с чешмяна вода на концентрирания изходен разтвор. Необходимото количество се измерва с мерителен цилиндър и се добавя в чист съд за входящи води. Също така, към синтетичните отпадъчни води преди разреждането при необходимост се добавя необходимото количество изходен разтвор на изпитвания химикал или на референтния химикал. Ако е по-удобно, или ако е необходимо да се избегне загуба на изпитвания химикал, в отделен съд се приготвя отделен разреден разтвор на изпитвания химикал, и той се подава към наклонените тръби с отделна помпа за дозиране.
30. Вместо това (и за препоръчване) може да се използват утаени битови отпадъчни води (точка 24), които се събират, ако е възможно, всеки ден.

*Функциониране на реакторите с въртящи се тръби*

31. За оценката на един изпитван химикал са необходими два идентични реактора с въртящи се тръби, и те се сплюбват в помещение с постоянна температура, обикновено равна на  $22 \pm 2$  °C.
32. Перисталтичната помпа се регулира да подава  $250 \pm 25$  ml/h органична среда (без изпитван химикал) в наклонените тръби, които се въртят със скорост  $18 \pm 2$  об/мин. Тръбите на помпата се намазват със смазочното масло (точка 25) в началото на изпитването и периодично по време на самото изпитване, за да се гарантира правилното функциониране и да се удължи животът на тръбите.
33. Регулира се наклонът на тръбите по отношение на хоризонталата, за да се постигне време на престой на подаваната течност от  $125 \pm 12,5$  sec при чиста тръба. оценява се времето на задържане чрез добавяне на небиологичен маркер (напр. NaCl, инертно багрило) в подаваната течност: времето, необходимо за достигане на най-високата концентрация в изходящите води, се приема за средно време на задържане (когато филмът е максимално развит, времето на задържане може да нарасне до около 30 минути).
34. Установено е, посочените дебити, скорости и времена имат за резултат подходящи проценти на елиминиране (> 80 %) на DOC (или ХПК) и пораждат нитрифицирани изходящи води. Дебитът трябва да се промени, ако елиминирането е недостатъчно или ако се изисква да се симулира работата на конкретна пречиствателна станция. В последния случай се коригира дебитът на добавяне на органичната среда, докато функционирането на реактора не се уподоби на това на пречиствателната станция.



*Инокулиране*

35. Когато се използват синтетични отпадъчни води, инокулирането по въздушен път може да бъде достатъчно, за да започне растежът на микроорганизмите, като в противен случай към подаваната течност в продължение на три дни се добавят 1 ml/l утаени отпадъчни води.

*Измерване*

36. На равни интервали се проверява дали дебитът на дозиране и скоростта на въртене са в зададените граници. Освен това, измерва се рН на изходящите води, по-специално ако се очаква нитрификация.

*Проби и анализ*

37. Методът, схемата и честотата на вземането на проби се избират с оглед на целта на изпитването. Например, вземат се на случаен принцип проби от входящите и от изходящите води, или се събират проби през по-дълъг период, напр. 3—6 часа. През първия период, преди добавянето на изпитвания химикал, проби се вземат два пъти седмично. Пробите се филтруват през мембрани или се центрофугират при около 40 000 m/sec<sup>2</sup> за около 15 min (точка 18). Може да се окаже необходимо пробите да се оставят да се утаят или да се филтруват през груб филтър преди филтруването с мембрана. Определя се DOC (или ХПК) най-малко два пъти и, ако е необходимо, също и БПК, амониеви йони и нитрити/нитрати.
38. Всички анализи се извършват възможно най-бързо след събирането и подготвянето на пробите. Ако се налага отлагане на анализите, пробите се съхраняват при около 4 °C на тъмно в пълни догоре и плътно запушени бутилки. Ако се налага пробите да се съхраняват повече от 48 часа, те трябва да се съхранят чрез дълбоко замразяване, ацидификация или чрез добавяне на подходящ токсичен химикал (напр. 20 ml/l разтвор на живачен(II) хлорид с концентрация 10 g/l). Трябва да се вземат мерки техниките за съхранение да не влияят върху резултатите на анализа.

*Период на установяване*

39. През този период биофилмът по повърхността расте и достига оптималната си дебелина, което обикновено отнема 2 седмици и не следва да продължава повече от 6 седмици. Елиминирането (точка 44) на DOC (или ХПК) се увеличава и достига стойност в платото. Когато е достигнато плато при сходни стойности в двете тръби, едната от тях се избира за контролна за оставащото време на изпитването, през което техните показатели следва да остават съизмерими.

*Въвеждане на изпитвания химикал*

40. На този етап изпитвания химикал с необходимата концентрация, обикновено 10—20 mg C/l, се добавя към другия реактор. В контролната тръба продължава да се подава само органична среда.

*Период на аклиматизиране*

41. Продължават се анализите два пъти седмично на DOC (или ХПК) и, ако трябва да се оценява първичната биоразградимост, с помощта на специфичен анализ се измерва и концентрацията на изпитвания химикал. След първоначалното въвеждане на изпитвания химикал се изчаква от една до шест седмици (или по-дълго при специални условия), за да настъпи аклиматизация. Когато процентът на елиминиране (точки 43—45) достигне максималната си стойност, във фазата на плато в рамките на 3-седмичен интервал се определят 12—15 валидни стойности за оценка на средния процент на елиминиране. Изпитването се приема за завършено, ако е постигнат достатъчно висок процент на елиминиране. Обикновено изпитванията не трябва да продължават повече от 12 седмици след първото добавяне на изпитвания химикал.

*Отлепяне на филма*

42. Относително редовно от тръбите внезапно се отделят големи маси излишен филм — т.нар. „отлепяне“. За да се гарантира, че не е нарушена съпоставимостта на резултатите, изпитването следва да обхване най-малко два пълни цикъла на нарастване и отлепяне на филма.

**ДАННИ И ОТЧИТАНЕ****Обработка на резултатите**

43. Изчислява се процентът на елиминиране на DOC (или ХПК) на изпитвания химикал за всяка предвидена във времето оценка, като се използва уравнението:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

където

$D_t$  = процент на елиминиране на DOC (или ХПК) в момент  $t$ ;

$C_s$  = концентрация на DOC (или ХПК) във входящите води, дължаща се на изпитвания химикал, за предпочитане предвидена въз основа на концентрацията в изходния разтвор и на добавения обем от изходния разтвор (mg/l);

$E$  = измерена стойност на DOC (или ХПК) в изпитваните изходящи води в момент  $t$  (mg/l)

$E_0$  = измерена стойност на DOC (или ХПК) в изходящите води от контролния модул в момент  $t$  (mg/l).

Изчисленията се повтарят за референтния химикал, ако той е обект на изпитване.

#### Резултати на контролния реактор

44. Степента на елиминиране на DOC (или ХПК) ( $D_B$ ) на органичната среда в контролните реактори е полезна информация при оценката на биоразграждането, извършвано от биофилма по време на изпитването. Процентът на елиминиране се изчислява с уравнението:

$$D_B = 100 (1 - E_0/C_m) \%$$

където

$C_m$  = DOC (или ХПК) на органичната среда във входящите води на контролния реактор (mg/l).

45. Изчислява се елиминирането ( $D_{ST}$ ) на изпитвания химикал, ако е последният измерван със специфичен метод за анализ във всеки момент на оценката, като се използва уравнението:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

където

$S_i$  = измерена или — за предпочитане — очаквана концентрация на изпитвания химикал в изпитваните входящи води (mg/l)

$S_e$  = измерена концентрация на изпитвания химикал в изпитваните изходящи води момент  $t$  (mg/l)

Ако аналитичният метод дава положителна стойност при неизменени отпадъчни води, която е еквивалентна на  $S_e$  mg/l, процентът на елиминиране ( $D_{SC}$ ) се изчислява по следната формула:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_d)/(S_i + S_e) \%$$

#### Изразяване на резултатите от изпитването

46. Начертава се кривата на процентите на елиминиране  $D_t$  и  $D_{ST}$  (или  $D_{SC}$ ), ако са известни, в зависимост от времето (вж. допълнение 2 в глава B.10-A). Като процент на елиминиране на изпитвания химикал се приема средната стойност (закръглена към най-близкото цяло число) и стандартното отклонение на 12—15 стойности на  $D_T$  (и на  $D_{ST}$ , ако са известни), получени по време на фазата на плато. От формата на кривата на елиминирането на изпитвания химикал могат да се направят някои изводи за процеса на елиминиране.

#### Адсорбция

47. Ако се наблюдава висока степен на елиминиране на DOC на изпитвания химикал в началото на изпитването, изпитваният химикал вероятно е елиминиран чрез адсорбция в биофилма. Това е възможно да се докаже чрез определяне на адсорбиран изпитван химикал в отлепената маса на филма. Не е обичайно степента на елиминиране на DOC на адсорбируеми химикали да бъде висока през цялото изпитване; нормално е първоначално да е налице висока степен на елиминиране, която постепенно намалява до достигането на равновесна стойност. Ако обаче адсорбираният изпитван химикал е способен да предизвика аклиматизиране на микробната популация, степента на елиминиране на DOC на изпитвания химикал може по-късно да нарасне и да достигне до високи стойности в платото.

#### Латентна фаза

48. Както и в статичните пресяващи изпитвания, преди пълното проявяване на биоразграждането се наблюдава латентна фаза при много изпитвани химикали. По време на латентната фаза, аклиматизирането или адаптирането на разграждащите бактерии протича при почти пълна липса на елиминиране на изпитвания химикал; след това започва първоначалният растеж на бактериите. Когато са елиминирани около 10 % от първоначалното количество от изпитвания химикал (след адсорбция, ако е протекла такава), тази фаза завършва и условно се допуска, че започва фазата на разграждането. Латентната фаза често е много променлива и слабо възпроизводима.

#### Фаза на плато

49. Фазата на плато на кривата на елиминирането при непрекъснато изпитване се определя като фазата, по време на която се извършва максимално разграждане. Фазата на плато следва да трае поне 3 седмици и да бъде определена от около 12 до 15 измерени валидни стойности.

**Средна степен на елиминиране на изпитвания химикал**

50. Средната стойност се изчислява въз основа на стойностите на елиминирането  $D_t$  (и  $D_{st}$ , ако е известно) на изпитвания химикал във фазата на плато. След закръгляне към най-близкото цяло число (1 %) тя представлява степента на елиминиране на изпитвания химикал. Препоръчва се също да се изчисли и доверителен интервал от 95 % от средната стойност. По подобен начин се изчислява и средната степен ( $D_B$ ) на елиминиране на органичната среда в контролния съд.

**Признаци на биоразграждане**

51. Ако изпитваният химикал не се адсорбира в значителна степен в биофилма и кривата на елиминирането има типичната форма на крива на биоразграждане — с латентна фаза, фаза на разграждане и фаза на плато (точки 48 и 49), измереното елиминиране може със сигурност да се обясни с биоразграждане. Ако е налице силно начално елиминиране, с изпитването за симулиране не може да направи разграничаване между биологични и абиотични процеси на елиминиране. В подобни случаи, а и в други случаи, в които е налице съмнение по отношение на биоразграждането (напр. ако е настъпило разслояване), се предприема анализ на адсорбирания изпитван химикал в проби от филма или се извършва допълнително статично (пресяващо) изпитване за биоразграждане въз основа на параметри, ясно свидетелстващи за биологичен процес. Такива изпитвания са методите за определяне на потреблението на кислород (глава В.4 от настоящото приложение, Г, Д и Е) (9) или изпитване за измерване на отделянето на  $CO_2$  (глава В.4-В от настоящото приложение или метод за изпитване в свободно пространство) (10); използва се като инокулум предварително експониран биофилм от подходящ реактор.
52. Ако е измерено както елиминирането на DOC, така и елиминирането на специфичния химикал, наличието на значителна разлика между техните проценти на елиминиране (по-нисък за първото, отколкото за второто) показва наличието в изходящите води на междинни органични продукти, чието биоразграждане може да е по-трудно; тези продукти следва да бъдат изследвани.

**Валидност на резултатите**

53. Изпитването се приема за валидно, ако степента на елиминиране на DOC (или ХПК) в контролните модули е > 80 % след 2-седмично функциониране и не е наблюдавано нищо необичайно.
54. Ако е изпитан (референтен) химикал, който е лесно биоразградим, степента на биоразграждане трябва да бъде > 90 %, а разликата между стойности от паралелно изпитване не трябва да е по-голяма от 5 %. Ако резултатите не отговарят на тези два критерия, следва да се преразгледат процедурите за изпитване и/или да се използват битови отпадъчни води от друг източник.
55. Също така, стойностите на биоразграждането в паралелни модули (ако са използвани), в които се третира изпитваният химикал, не трябва да се различават с повече от 5 %. Ако този критерий не е изпълнен, но степента на елиминиране е висока, анализът продължава още три седмици. Ако степента на елиминиране е ниска, следва да се изследва инхибиращото въздействие на изпитвания химикал, ако не е известно, и да се повтори изпитването при по-ниска концентрация на изпитвания химикал, ако това е възможно.

**Доклад от изпитването**

56. В доклада от изпитването се включва следното:

*Изпитван химикал:*

- данни за идентифициране на химикала,
- физична природа и, където е подходящо, физични и химични свойства.

*Условия на изпитването:*

- всякакви изменения на изпитвателната система, по-специално ако са изпитвани неразтворими или летливи химикали,
- тип органична среда,
- съотношение и естество на индустриалните отпадъци в отпадъчните води, ако са използвани и ако са известни,
- метод на инокулиране,
- изходен разтвор на изпитвания химикал — съдържание на DOC (разтворен органичен въглерод) и TOC (общ органичен въглерод); ако се касае за суспензия — как е приготвена; използвана(и) при изпитването концентрация(и), причини, ако ХПК е извън обхвата 10—20 mg/l; метод на добавяне; дата на първото добавяне; промени на концентрацията,

- средно време на задържане на течността (без растеж) скорост на въртене на тръбата; приблизителен ъгъл на наклон, ако е възможно,
- данни за отлепването; време и интензивност,
- температура и температурен обхват при изпитването,
- използвани аналитични методи.

*Резултати от изпитването:*

- всички данни от измервания за DOC, ХПК, специфични анализи, рН, температура, азотсъдържащи химикали, ако е подходящо,
- всички изчислени стойности на  $D_t$  (или  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_s$ , представени в таблична форма, както и криви на елиминирането,
- информация за латентната фаза и за фазата на плато, продължителността на изпитването, степента на елиминиране на изпитвания химикал, тази на референтния химикал (ако е изпитана) и тази на органичната среда (в контролния модул), а също и статистически данни и декларации за биоразградимостта и валидността на изпитването,
- обсъждане на резултатите.

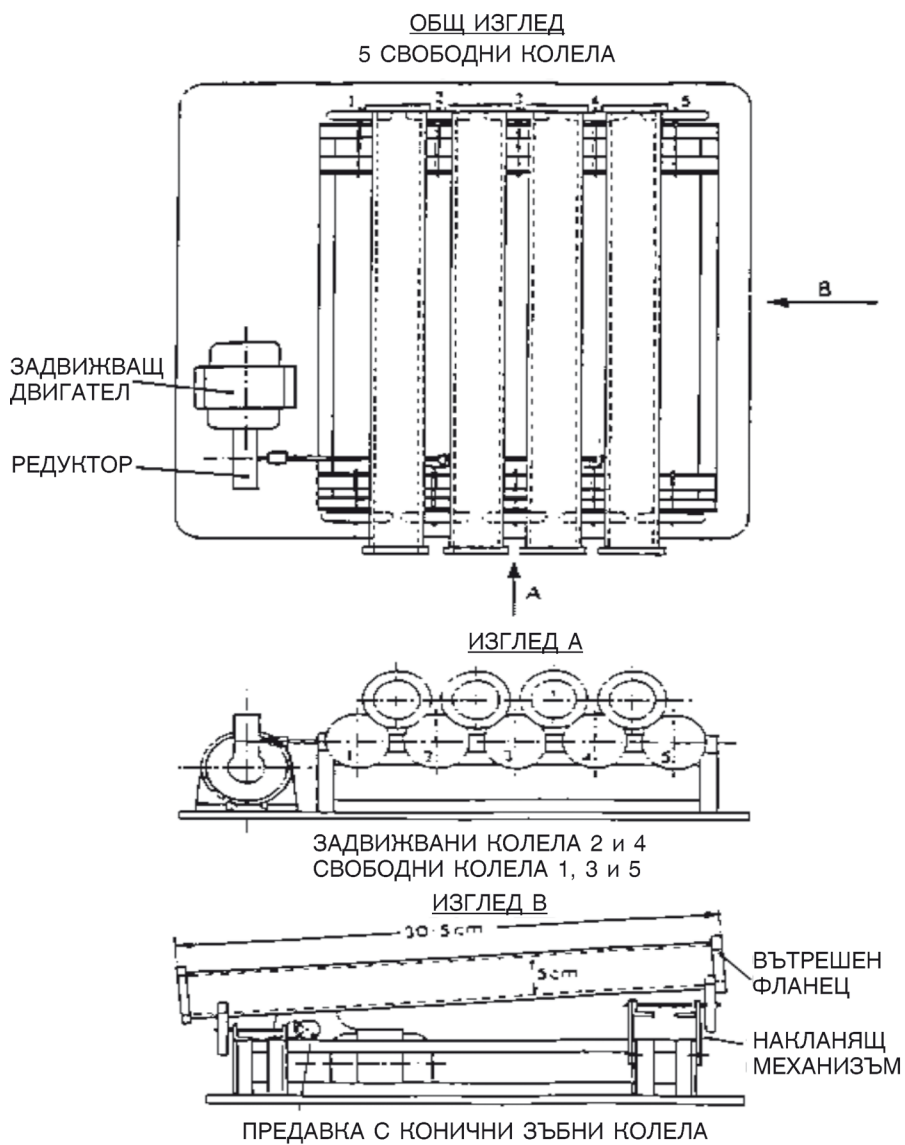
**ПРЕПРАТКИ:**

- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
- (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.
- (3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.
- (4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
- (5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCs* 43: 92-94.
- (6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
- (9) Глава 9 от настоящото приложение, Определяне на пълно биоразграждане А-Е.
- (10) ISO 14593 (1998). Качество на водата — Оценяване на крайната биоразградимост на органичните съединения във водна среда. Метод за изпитване с анализиране на освободения неорганичен въглерод в херметични съдове.

Допълнение 8

Фигура 1

Въртящи се гръби



Речник:

Общ изглед:

Изглед А/В:

Задвижвани колела:

Свободни колела:

Задвижващ двигател:

Редуктор:

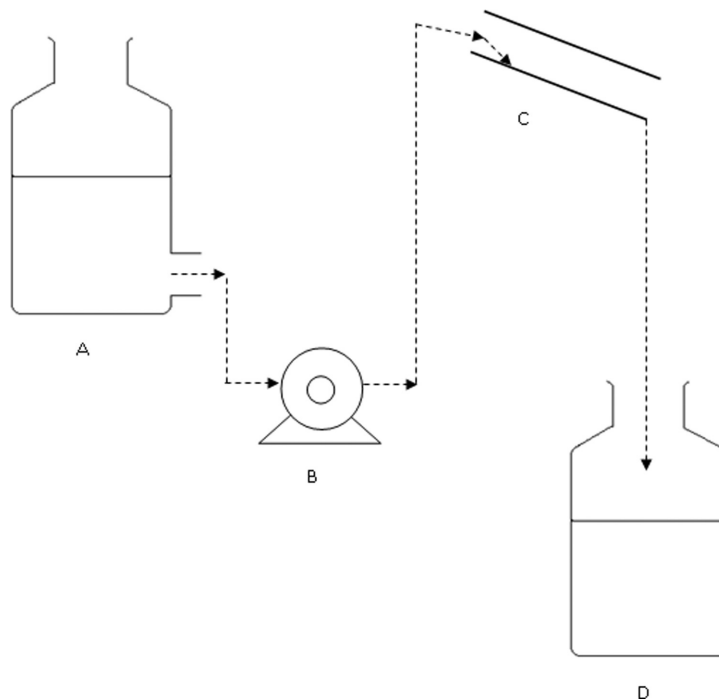
Вътрешен фланец:

Накланящ механизъм:

Предавка с конични зъбни колела:

Фигура 2

## Схема на протичането



- A: Захранващ резервоар  
 B: Перисталтична помпа  
 C: Въртяща се тръба  
 D: Съд за събиране на изходящи води

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Изпитван химикал: всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

Химикали: „следва да се отбележи, че терминът „химикал“ се използва широко в спогодбите на Конференцията за околната среда и развитие на ООН и в следващите документи за означаване на вещества, продукти, смеси, препарати, или всякакви други термини, които могат да се използват в рамките на съществуващите системи за означаване на разглежданите продукти“.

- 10) Добавят се следните глави B.27, B.28, B.29 и B.30:

**„B.27 ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА**

## УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на Насоките за изпитване (НИ) на ОИСП 218 (2004). Настоящият метод за изпитване е предназначен за оценка на въздействието на продължителната експозиция на химикали на живеещи в седимента ларви на сладководното двукрило *Chironomus* sp. Методът се основава на съществуващите протоколи за изпитване на токсичност за *Chironomus riparius* и *Chironomus tentans*, разработени в Европа (1)(2)(3) и Северна Америка (4)(5)(6)(7)(8) и подложени на кръгово изпитване (1)(6)(9). Могат да се използват и други добре документирани видове хириномиди, напр. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).
2. Сценарият за експозиция, който се използва в настоящия метод за изпитване, е добавяне към седимента на изпитваното вещество. Изборът на подходящ сценарий за експозиция зависи от предвиденото приложение на изпитването. Сценарият за добавяне към седимента е предназначен за симулиране на натрупване на химикали, които трайно се задържат в седимента. Този начин на експозиция включва добавяне към седимент в системата седимент-вода.
3. Веществата, които трябва да бъдат изпитани с помощта на организми, живеещи в седимента, обикновено са устойчиви в тази естествена среда за дълги периоди от време. Живеещите в седимента организми могат да бъдат експонирани по различни пътища. Относителната важност на всеки път на експозиция и времето,

необходимо за всеки от тях да способства за общото токсично въздействие, зависят от физичните и химичните свойства на съответния химикал. За силно адсорбиращите вещества (напр. с  $\log K_{ow} > 5$ ) или за вещества, които образуват ковалентна връзка със седимента, поглъщането на замърсена храна може да бъде значим път на експозиция. За да не се подцени токсичността на силно липофилните вещества, може да се разгледа възможността за добавяне на храна в седимента, преди да бъде приложено изпитваното вещество. За да се вземат предвид всички възможни пътища на експозиция, настоящият метод за изпитване е ориентиран главно към експозицията в дългосрочен план. Продължителността на изпитването е от 20 до 28 дни за *C. riparius* и *C. yoshimatsui*, и 28—65 дни за *C. tentans*. Ако за определена специфична цел се изискват данни в краткосрочен план, за да се изследва например въздействието на нестабилен химикал, допълнителните повторения могат да се прекратят след период от десет дни.

4. Измерваните крайни точки са общият брой на имагинираните възрастни и времето до имагиниране. Ако са необходими допълнителни данни в краткосрочен план, препоръчва се измерването на преживяването и растежа на ларвите да се извършва едва след десетдневен период, като се използват, ако е необходимо, допълнителни повторения.
5. Препоръчва се употребата на приготвен седимент. Приготвеният седимент има някои преимущества пред естествените такива:
  - намалява се експерименталното вариране, тъй като приготвеният седимент играе ролята на „стандартна матрица“ и отпада необходимостта да се намират източници на незамърсен и чист седимент,
  - изпитванията могат да започнат по всяко време, без да се влияят от сезонната променливост на включения в изпитването седимент, и без да се налага седиментът да се подлага на предварителна подготовка за отстраняване на собствената му фауна; използването на приготвен седимент намалява и разходите във връзка със събирането в полеви условия на достатъчно количество седимент за рутинните изпитвания,
  - използването на приготвен седимент позволява сравняване на токсичността и съответно подреждане на веществата.
6. Определенията са дадени в допълнение 1.

#### ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

7. Ларви на хирономиди в първи ларвен стадий се излагат на обхват от концентрации на изпитвания химикал в система вода – седимент. Изпитваното вещество се добавя към седимента и ларвите в първи ларвен стадий се въвеждат в изпитвателните бехерови чаши, в които концентрацията на вода и седимент са били стабилизирани. В края на изпитването се измерва имагинирането на хирономидите и скоростта им на развитие. Може също да се измери и преживяването и теглото на ларвите след 10 дни, ако е необходимо (като се използват, ако трябва, допълнителни повторения). Данните се анализират, като се използва регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която предизвиква намаляване с  $x$  % на растежа или на имагинирането или преживяването на ларвите (напр.  $EC_{15}$ ,  $EC_{50}$  и т.н.), или като се използва проверка на статистическа хипотеза за определяне на NOEC/LOEC. Последното изисква сравнение на стойностите, при които се наблюдава въздействие, с контролните стойности, като се използват статистически проверки.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОТНОСНО ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

8. Разтворимостта във вода и парното налягане на изпитваното вещество, измереното или изчисленото му разпределение в седимента и стабилността му във вода и в седимент следва да са известни. Следва да е на разположение и надежден метод за анализ за количествено определяне на веществото във водата над седимента, във водата в порите и в седимента, чиито точност и граница на откриване са известни и отчетени. Ползена информация са структурната формула и чистотата на изпитваното вещество. Информация за химическата трансформация на изпитваното вещество (разсейване, абиотично и биотично разграждане и т.н.) също е полезна. Допълнителни насоки за изпитване на вещества с физични и химични свойства, които ги правят трудни за изпитване, са дадени в (12).

#### РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

9. Референтните химикали може да се изпитват периодично като средство за потвърждение, че протоколът за изпитване и условията на изпитване са надеждни. Могат да се посочат като пример следните референтни токсични вещества, използвани успешно в кръгови изпитвания и в изследвания за валидиране: линдан, трифлуралин, пентахлорофенол, кадмиев хлорид и калиев хлорид (1)(2)(5)(6)(13).

#### ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

10. За да бъде изпитването валидно, се прилагат се следните условия:
  - в края на изпитването имагинирането в контролните експерименти трябва да бъде поне 70 % (1)(6),
  - имагинирането на *C. riparius* и *C. yoshimatsui* в контролните съдове трябва да настъпва между 12 и 23 дни след въвеждането им в съдовете; за *C. tentans* е необходим период от 20 до 65 дни,

- в края на изпитването следва да се измери рН и концентрацията на разтворения кислород във всички съдове. Концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде поне 60 % от стойността на насищане на въздуха при използваната температура, а рН на водата над седимента следва да бъде в обхвата 6—9 във всички съдове, в които се извършва изпитването,
- температурата на водата не трябва да се колебае с повече от  $\pm 1$  °C и може да се контролира в изотермично помещение, като в този случай температурата в помещението трябва да се потвърждава на подходящ интервал от време.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Съдове за извършване на изпитването

11. Изпитването се извършва в стъклени бехерови чаши с вместимост 600 ml и диаметър 8 cm. Подходящи са и други съдове, но те следва да осигуряват подходяща дълбочина на водата над седимента и на самия седимент. Площта на седимента трябва да бъде достатъчна, за да осигурява 2 до 3 cm<sup>2</sup> на ларва. Съотношението между дебелината на слоя седимент и тази на водата над него трябва да бъде 1:4. Съдовете за изпитване и другото оборудване, което ще влезе в контакт с изпитваната система, следва да бъде изцяло от стъкло или от друг химически инертен материал (напр. тефлон).

##### Избор на видове

12. Видът, който трябва да се използва при изпитването, е за предпочитане *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* също е подходящ, но с него се борави по-трудно и е необходим по-дълъг период на изпитване. *Chironomus yoshimatsui* също може да бъде подходящ. Подробности за методите на отглеждане на *Chironomus riparius* са дадени в допълнение 2. Налична е и информацията за условията на отглеждане на други видове, т.е., *Chironomus tentans* (4) и *Chironomus yoshimatsui* (11). Идентичността на видовете трябва да се потвърждава преди изпитването, но не е задължителна преди всеки експеримент, ако организмите са получени при отглеждане в изпитващата лаборатория.

##### Седимент

13. За предпочитане е да се използва приготвен седимент (наричан още възстановен, изкуствен или синтетичен седимент). Ако обаче се използва естествен седимент, трябва да се определят характеристиките му (най-малко рН и съдържание на органичен въглерод, а определянето на други параметри, напр., на съотношението C/N и зърнометричния състав, също се препоръчва), той следва да бъде незамърсен и в него да няма други организми, които да се конкурират с хириноmidите, или да се хранят с тях. Препоръчва се също така, преди използването му в изпитване за токсичност за хириноmidи, естественият седимент да бъде държан в продължение на седем дни при същите условия, при които ще се провежда изпитването. За използване в описаното тук изпитване (1)(15)(16) се препоръчва следният седимент, приготвен въз основа на изкуствената почва, използвана в метод за изпитване В.8 (14):
  - а) 4—5 % торф (сухо тегло): с рН възможно най-близо до обхвата 5,5—6,0; важно е да се използва торф под формата на прах, ситно смлян (размер на частиците 1 mm) и изсушен само с въздух;
  - б) 20 % каолин (сухо тегло) (за предпочитане съдържанието на каолинит да е повече от 30 %);
  - в) 75—76 % кварцов пясък (сухо тегло) (трябва да преобладава финият пясък с размер на над 50 % от частиците между 50 и 200  $\mu$ m);
  - г) добавя се дейонизирана вода, така че да влажността на крайната смес да бъде в обхвата 30—50 %;
  - д) добавя се химически чист калциев карбонат (CaCO<sub>3</sub>), за да се коригира рН на крайната смес на седимента до  $7,0 \pm 0,5$ . Съдържанието на органичен въглерод в крайната смес следва да бъде 2 % ( $\pm 0,5$  %) и да бъде коригирано, като се използват подходящи количества торф и пясък, в съответствие с (а) и (в).

14. Източниците на торф, каолин и пясък трябва да са известни. Съставките на седимента следва да се проверят за наличие на химическо замърсяване (напр. тежки метали, органиохлорни, органиофосфорни съединения и т.н.). Пример за изготвянето на приготвен седимент е даден в допълнение 3. Допустимо е също и смесването на сухи съставки, ако се докаже, че след добавянето на вода над седимента не настъпва разделяне на съставките на седимента (напр. изплуване на торфените частици), и че торфът или седиментът са подготвени в необходимата степен.

##### Вода

15. Всяка вода, която отговаря на химичните характеристики за вода, приемлива за използване за разреждане, както са изброени в допълнение 2 и 4, е подходяща да се използва като вода за изпитването. Всяка подходяща вода, природна вода (от повърхностни или подпочвени води), реконституирана вода (вж. допълнение 2) или дехлорирана чешмяна вода може да се използва за отглеждане и за изпитване, ако хириноmidите оцеляват в нея за времето на отглеждане и изпитване, без да показват признаци на стрес. В началото на изпитването рН на водата за изпитване трябва да бъде между 6 и 9, а общата ѝ твърдост — не по-висока от 400 mg/l, изразена като



CaCO<sub>3</sub>. Ако обаче се предполага взаимодействие между йоните, от които произтича твърдостта, и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt Medium M4“). По време на цялото изпитване трябва да се използва един и същи тип вода. Качествените параметри на водата, изброени в допълнение 4, следва да се измерват поне два пъти годишно или всеки път когато има подозрение, че тези характеристики може да са се променили значително.

#### Исходни разтвори — седименти с добавка

16. Обикновено седименти те с добавка с избрана концентрация се приготвят чрез добавяне на разтвор на изпитваното вещество директно към седимента. Исходен разтвор на изпитваното вещество, разтворено в дейонизирана вода, се смесва с приготвения седимент с помощта на валцова мелница, смесител за фураж, или смесване с ръка. Ако е малко разтворимо във вода, изпитваното вещество може да бъде разтворено във възможно най-малък обем подходящ органичен разтворител (например хексан, ацетон или хлороформ). След това този разтвор се смесва с 10 g фин кварцов пясък за всеки съд за изпитване. Остава се разтворителят да се изпари и същият следва да бъде напълно елиминиран от пясъка; тогава пясъкът се смесва с необходимото количество седимент за всяка бехерова чаша за изпитването. За разтваряне, диспергиране или емулгиране на изпитваното вещество могат да се използват само средства, които лесно се изпаряват. Трябва да се помни, че пясъкът, добавен заедно с изпитваното вещество и пясъчната смес, трябва да се взема предвид при приготвянето на седимента (т.е., седиментът трябва следователно да се приготвя с по-малко количество пясък). Трябва да се внимава изпитваното вещество, добавено към седимента, да бъде старателно и равномерно разпределено в целия му обем. Ако е необходимо, може да се анализират проби от пробите, за да се определи степента на хомогенност.

#### ПЛАН НА ИЗПИТВАНЕТО

17. Планът на изпитването се отнася до избор на броя на стойностите на концентрацията на изпитване и интервалите между тези стойности, броя на съдовете за всяка концентрация и броя на ларвите във всеки съд. Описани са плановете на изпитване за определяне на точките на концентрация, при която се проявява въздействие (EC), за определяне на NOEC и за провеждане на гранично изпитване.

#### Планиране на регресионен анализ

18. Концентрацията, при която се проявява въздействие (напр. EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub>) и интервалът концентрации, над които въздействието на изпитваното вещество е от значение, следва да бъдат обхванати от концентрациите, включени в изпитването. По принцип точността, и по-специално валидността, с която може да се направи оценка на стойностите на концентрацията на въздействие (EC<sub>x</sub>), се повишава, когато концентрацията на въздействие е в обхвата на изпитваните стойности на концентрацията. Следва да се избягват екстраполации за стойности, много по-ниски от най-ниската концентрация на въздействие или по-високи от най-високата концентрация. За избора на интервал от концентрации, които да се изпитат, е полезно да се извърши предварително изпитване за определяне на обхвата (вж. точка 27).
19. Ако трябва да се направи оценка на EC<sub>x</sub>, следва да се направи изпитване при най-малко пет концентрации и по три повторения за всяка концентрация. Във всички случаи, препоръчва се да се използват достатъчно стойности на концентрациите на изпитване, за да може да се получи удовлетворителна оценка чрез модела. Коефициентът, с чиято помощ се получава следващата концентрация, не бива да бъде по-голям от две (може да се направи изключение в случаите, в които кривата на зависимостта на отговора от дозата има твърде слаб наклон). Броят на повторенията за всяко третиране може да се намали, ако броят на изпитваните концентрации, които предизвикват различен отговор, се увеличи. Увеличаването на броя на повторенията или съкращаването на интервала между концентрациите обикновено води до стесняване на доверителния интервал на изпитването. Ако трябва да се направи оценка на 10-дневното преживяване и растеж на ларвите, необходими са допълнителни повторения.

#### Планиране за оценка на NOEC/LOEC

20. Ако трябва да се оценят NOEC или LOEC, следва да се направи изпитване при пет концентрации с най-малко по четири повторения, а коефициентът между стойностите на концентрациите не бива да е по-голям от две. Броят на повторенията следва да е достатъчен за осигуряване на достатъчно статистическа мощност за откриване на разлика от 20 % по отношение на контролата при равнище на значимост от 5 % (p = 0,05). По отношение на скоростта на развитие, обикновено е подходящо да се предприеме дисперсионен анализ (ANOVA), напр., тест на Dunnett и тест на Williams (17)(18)(19)(20). По отношение на коефициента на имагиниране може да се използва тестът на Cochran-Armitage, точният тест на Fisher (с корекция на Bonferroni), или тестът на Mantel-Haenszel.

#### Гранично изпитване

21. Може да се предприеме гранично изпитване (с една концентрация за изпитване и една контрола), ако не е наблюдавано въздействие в предварителното изпитване за определяне на обхвата. Предназначението на граничното изпитване е да се извърши изпитване при достатъчно висока концентрация, така че да се позволи на лицата, вземащи решения, да отхвърлят възможно токсично въздействие на изпитваното вещество, като за прагова стойност се избира концентрация, каквато не се очаква да се прояви при каквато и да било ситуация. Препоръчва се 1 000 mg/kg (сухо тегло). Обикновено са необходими най-малко шест повторения както на третирането, така и на контрола. Следва да се докаже наличието на достатъчно статистическа мощност за откриване на разлика от 20 % по отношение на контролата при равнище на значимост от 5 % (p = 0,05). При метричен отговор (скорост на развитие и тегло), t-тестът е подходящ статистически метод, ако данните отговарят на изискванията на теста (нормалност, хомогенни дисперсии). Може да се използва и t-тест с нееднаква дисперсия или непараметричен тест, напр. тест на Wilcoxon-Mann-Whitney, ако изискванията не са изпълнени. По отношение на коефициента на имагиниране, точният тест на Fisher е подходящ.

## ПРОЦЕДУРА

**Условия на експозиция***Приготвяне на системата седимент с добавка — вода*

22. За прилагане на изпитваното вещество се препоръчва процедурата за добавяне, описана в метод за изпитване В.8: „Токсичност за червей“ (14). Седиментите с добавка се поставят в съдовете и се добавя водата до получаване на обемно съотношение седимент — вода 1:4 (вж. точки 11 и 15). Дълбочината на слоя седимент трябва да бъде между 1,5 и 3 cm. За да се избегне разделяне на съставките на седимента и повторно суспендиране на фините частици по време на добавянето на водата за изпитването във водната колона, седиментът може да се покрие с пластмасов диск, докато се налива водата, веднага след което дискът да се извади. Могат да бъдат подходящи и други устройства.
23. Съдовете за изпитването следва да бъдат покрити (напр. със стъклени пластинки). Ако е необходимо, по време на изследването съдовете се допълват до първоначалния обем, за да се компенсира изпаряването на водата. Това следва да се извърши, като се използва дестилирана или дейонизирана вода, за да се избегне образуването на соли.

*Стабилизирание*

24. След като е приготвена системата от седимент с добавка и вода, желателно е да се даде възможност изпитваното вещество да се разпредели между течната фаза и седимента (3)(4)(6)(13). За препоръчване е това да стане при температурата и аерирането, използвани при изпитването. Подходящото време за установяване на равновесие зависи от седимента и химикала и може да варира от няколко часа до дни, дори до няколко (4—5) седмици в редки случаи. Тъй като това би довело до разграждането на много химикали, не се чака установяване на равновесие, а се препоръчва период за уравновесяване, равен на 48 часа. В края на този допълнителен период, следва да се измери концентрацията на изпитваното вещество във водата над седимента, водата в порите и водата в седимента, най-малкото при най-високата и при по-ниска концентрация (вж. точка 38). Посочените измервания на изпитваното вещество дават възможност за изчисляване на масовия баланс и изразяване на резултатите въз основа на измерените концентрации.

*Добавяне на организмите за изпитването*

25. Четири до пет дни преди добавянето на организмите за изпитването в съдовете за изпитване, агломератите от яйца следва да се извадят от съдовете за отглеждане и да се сложат в малки съдове в среда за отглеждане. Може да се използва зряла среда от озони, в която е отглеждана изходната култура, или прясно приготвена среда. Ако се използва прясно приготвена среда, към средата за отглеждане се добавя малко количество храна, т.е., зелени водорасли и/или няколко капки филтрат от суспензия от фино смляна храна за рибки (вж. допълнение 2). Следва да се използват само прясно снесени агломерати от яйца. Като правило, ларвите започват да се излюпват няколко дни след снасянето на яйцата (2 до 3 за *Chironomus riparius* при 20 °C, 1 до 4 за *Chironomus tentans* при 23 °C и *Chironomus yoshimatsui* при 25 °C, а растежът на ларвите преминава през четири стадия, всеки от които трае от 4 до 8 дни. В изпитването следва да се използват ларви в първи стадий на развитие (2—3 или 1—4 дни след излюпването). Стадият на развитие на насекомите може да се провери чрез проверка на широчината на капсулата на главата (6).
26. Двадесет ларви в първи ларвен стадий се разпределят на случаен принцип във всеки съд за изпитване, който съдържа седимент с добавка и вода, като се използва пипета с тъп край. Аерирането на водата трябва да се спре, когато ларвите се добавят в съдовете за изпитване, и да остане в това състояние 24 часа след добавянето (вж. точки 25 и 32). В зависимост от използвания план на изпитването (вж. точки 19 и 20), броят на ларвите, използвани за всяка концентрация е най-малко 60 за оценка на точка на концентрация, при която се проявява въздействие, и 80 за определяне на NOEC.

*Концентрации на изпитване*

27. За определяне на интервала от концентрации за същинското изпитване може да бъде от полза извършването на изпитване за определяне на обхвата. За тази цел се използва серия от много раздалечени концентрации на изпитваното вещество. За да се осигури гъстота на хириномиди на повърхността, еднаква с използваната в същинското изпитване, хириномидите се експонират на всяка една концентрация на изпитваното вещество за период, който позволява оценка на подходящите концентрации за изпитването, като не са необходими повторения.
28. Концентрациите за същинското изпитване се определят въз основа на резултата от изпитването за определяне на обхвата. Следва да се използват най-малко пет концентрации, които се избират, както е описано в точки 18—20.

*Контролни съдове*

29. В изпитването трябва да се включи и съответният брой контролни съдове без изпитвано вещество, но със седимент (вж. точки 19 и 20), като се предвиди съответният брой повторения. Ако за прилагането на изпитваното вещество е използван разтворител (вж. точка 16), следва да се добави и контролен съд със седимент с разтворител.

*Системи за изпитване*

30. Използват се статични системи. Могат да се използват и полустатични системи или такива с периодично или непрекъснато обновяване на водата над седимента в изключителни случаи, например, когато спецификациите на качеството на водата станат неподходящи за организма, с който се провежда изпитването, или когато се нарушава химическото равновесие (напр. нивото на разтворения кислород е твърде ниско, концентрацията на продукти от екскреция е прекалено висока, или от седимента се просмукват минерали и влияят на стойността на рН и/или твърдостта на водата). Въпреки това, други методи за подобряване на качеството на водата над седимента, като напр. аериране, обикновено са достатъчни и са за предпочитане.

*Храни*

31. Необходимо е да се хранят ларвите, за предпочитане всеки ден или най-малко три пъти седмично. Храната за рибки (суспензия във вода или фино смляна храна, напр. Tetra-Min или Tetra-Phyll; вж. подробности в допълнение 2) в количество по 0,25—0,5 mg (0,35—0,5 mg за *C. yoshimatsu*) на ларва на ден изглежда подходяща за млади ларви в първите 10 дни. За по-възрастни ларви е необходима малко повече храна: 0,5—1 mg за ларва за ден трябва да е достатъчно за оставащото време на изпитването. Дажбата храна на всички опитни и контролни организми следва да се намали, ако е забелязано развитие на гъбички, или ако сред контролните организми има смъртност. Ако е невъзможно да се спре развитието на гъбички, изпитването трябва да се повтори, когато се изпитват силно адсорбиращи вещества (напр. с  $\log K_{ow} > 5$ ) или вещества, които се свързват ковалентно със седимента, количеството храна, необходима за гарантиране на преживяването и нормалното развитие на организмите, може да се добави към приготвения седимент преди периода на стабилизация. За тази цел вместо храна за рибки трябва да се използва растителна материя, например да се добавят 0,5 % (сухо тегло) фино смлени листа от коприва (*Urtica dioica*), черница (*Morus alba*), бяла детелина (*Trifolium repens*), спанак (*Spinacia oleracea*) или друг растителен материал (*Cerophyl* или алфа-целулоза).

*Условия за инкубиране*

32. Водата над седимента в съдовете за изпитване леко се аерира, за предпочитане 24 часа след добавянето на ларвите, като аерирането продължава през цялото време на изпитването (следва да се вземат мерки концентрацията на кислород да не пада под 60 % от стойността на насищане във въздух. Аерирането се осъществява с помощта на стъклена пипета „Пастър“, закрепена на 2—3 cm над слоя седимент (едно или няколко мехурчета в секунда), когато се изпитват летливи химикали, следва да се разгледа възможността да не се аерира системата седимент-вода.
33. Изпитването се провежда при постоянна температура 20 °C ( $\pm 2$  °C). Препоръчаните за *C. tentans* и *C. yoshimatsu* температури са съответно 23 °C и 25 °C ( $\pm 2$  °C). Продължителността на излагане на светлина е 16 часа, а интензитетът на светлината трябва да бъде между 500 и 1 000 lux.

*Продължителност на експозицията*

34. Експозицията започва с поставянето на ларвите в съдовете с изпитваното вещество и в контролните съдове. Максималната продължителност на експозицията е 28 дни за *C. riparius* и *C. yoshimatsu* и 65 за *C. tentans*. Ако насекомите имагинират по-рано, изпитването може да се прекрати след най-малко пет дни след имагинирането на последното възрастно насекомо в контролните съдове.

**Наблюдения***Имагиниране*

35. Определя се времето на развитие и общият брой на напълно имагинирани мъжки и женски насекоми. Мъжките лесно се разпознават по перестите си антени.
36. Съдовете за изпитване се наблюдават най-малко три пъти седмично, за да се оцени визуално дали не е налично ненормално по отношение на контролите поведение (напр. напускане на седимента, необичайно плуване). През периода, когато се очаква имагинирането на насекомите, е необходимо ежедневно броене на имагиниралите индивиди. Полът и броят на напълно имагиниралите насекоми се записва всеки ден. След разпознаване насекомите се изваждат от съдовете. Всички агломерати яйца, снесени преди завършването на изпитването, се записват и изваждат, за да се предотврати повторно въвеждане на ларви и седимента. Броят на видимите пашкули, които не са имагинирани, също се записва. В допълнение 5 са дадени насоки за измерването на имагинирането.

*Растеж и преживяване*

37. Ако трябва да се получат данни за преживяването и растежа на ларвите след 10-ия ден, в началото на изпитването в него се включват допълнителни съдове за изпитване, така че да могат да бъдат използвани по-късно. Седиментът от тези допълнителни съдове се пресява през сито с размер на отворите 250  $\mu$ m, за да се задържат ларвите. Критериите за смърт са неподвижност или липса на реакция спрямо механичен стимул. Липсващите ларви също се смятат за мъртви (ларвите, които са умрели в началото на изпитването, може да са били разградени от микроби). Определя се сухото тегло (без пепел) на оцелелите ларви за съд и се изчислява средното индивидуално сухо тегло за съд. Полезно е да се определи на кой стадий на развитие се намират ларвите; за целта може да се използва широчината на капсулата на главата на всеки индивид.

### Аналитични измервания

*Концентрация на изпитваното вещество*

38. Преди започването на изпитването (т.е. преди въвеждането на ларвите) се вземат проби от седимента от най-малко един съд на третиране, за аналитично определяне концентрацията на изпитваното вещество в седимента. Препоръчва се, като минимум да се анализират проби от водата над седимента, водата от порите и седимента в началото (вж. точка 24) и в края на изпитването, при най-високата концентрация и при по-ниска такава. Посоченото определяне на концентрацията на изпитваното вещество дава информация за трансформациите/разпределението му в системата вода-седимент.
39. Когато се правят междинни измервания (напр. на 7-ия ден) и ако анализът изисква големи проби, които не могат да се вземат от лабораторните съдове, без да се повлияе върху системата за изпитване, аналитичните определяния следва да се извършват върху проби от допълнителните съдове за изпитване, които са третирани по същия начин (включително присъствието на организми за изпитването), но които не се използват за биологични наблюдения.
40. За изолиране на интерстициалната вода се препоръчва центрофугиране при 10 000 g и 4 °C в продължение на 30 min. Ако обаче изпитваното вещество не се адсорбира от филтрите, филтруването също е приемливо. В някои случаи не е възможно да се анализират концентрациите във водата от порите, тъй като пробата е с много малък размер.

*Физични и химични параметри*

41. pH и температурата на съдовете за изпитване следва да се измерват по подходящ начин (вж. точка 10). Твърдостта и амониакът се измерват в контролните съдове и в един съд за изпитване при най-високата концентрация в началото и в края на изпитването.

### ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

*Обработка на резултатите*

42. Целта на настоящото изпитване е да се определи въздействието на изпитваното вещество върху скоростта на развитие и общия брой на достигналите до стадий на имаго мъжки и женски хириномиди, а при 10-дневното изпитване — въздействието върху преживяването и теглото на ларвите. Ако няма указания, че съществуват статистически значими различия между половете по отношение на чувствителността към изпитваното вещество, резултатите за мъжките и женските индивиди могат да се обединят за целите на статистическия анализ. Разлики в чувствителността между половете могат да се оценят статистически с помощта напр. на табличния тест  $\chi^2$ -г × 2. Преживяването на ларвите и средното индивидуално сухо тегло за всеки съд следва да се определи след 10 дни, ако това се изисква.
43. Концентрациите, оказващи въздействие, изразени и основани на сухото тегло, се изчисляват за предпочитане въз основа на измерените концентрации в седимента в началото на изпитването (вж. точка 38).
44. За да се изчисли конкретна прогнозна стойност на  $EC_{50}$  или всяка друга стойност  $EC_x$ , статистическите данни за всеки съд може да се използват като истински повторения. При изчисляването на доверителния интервал за всяка стойност на  $EC_x$ , трябва да се вземе предвид варирането между съдовете, или трябва да се покаже, че то е толкова малко, че може да се пренебрегне. Когато моделът е коригиран с помощта на метода на най-малките квадрати, трябва да се приложи трансформация към статистическите данни за съд, за да се подобри хомогенността на дисперсията. Стойностите обаче на  $EC_x$  следва да се изчисляват след като отговорът бъде трансформиран обратно в първоначалната стойност.
45. Когато със статистическия анализ се цели определяне на NOEC/LOEC чрез проверка на хипотези, варирането между съдовете трябва да се взема под внимание, напр. с помощта на „вложена“ ANOVA. Като алтернатива, при ситуации, в които са налице нарушения на обичайните допускания на ANOVA, може да се окажат полезни по-силни изпитвания (21).

*Съотношение на имагиниране*

46. Стойностите на съотношението на имагиниране (СИ) са данни с две възможни алтернативни значения и могат да се анализират с теста на Cochran-Armitage, който се прилага регресивно, когато се очаква монотонна зависимост между дозата и отговора, а тези данни потвърждават очакванията. В противен случай може да се използва точният тест на Fisher или тестът на Mantel-Haenszel с коригирани по Bonferroni-Holm p-стойности. Ако между повторения при една и съща концентрация са налице данни за по-голямо вариране, отколкото би показало биомно разпределение (често наричано „екстра биомно“ вариация), прилага се устойчив тест на Cochran-Armitage или точен тест на Fisher, както се предлага в (21).

Сборът от достигналите до стадий на имаго насекоми на съд,  $n_e$ , се определя и се разделя на броя на въведените ларви  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

където:

$ER$  = съотношение на имагиниране

$n_e$  = брой на достигналите до стадий на имаго насекоми на съд

$n_a$  = брой на въведените ларви на съд

47. Алтернативното решение, което е най-пригодно за големи извадки, когато е налице екстра биомна дисперсия, е да се третира съотношението на имагиниране като непрекъснат отговор и да се използват процедури като тест на William, когато се очаква монотонна зависимост между дозата и отговора и тя съответства на тези данни за съотношението на имагиниране. Когато е нарушена монотонността, подходящ е тестът на Dunnett. Като голяма извадка тук се определя такава, при която броят както на имагиниралите, така и на неимагиниралите хиროномиди надвишава пет за всяко повторение (съд).
48. За да се приложат методите на ANOVA, стойностите на СИ трябва първо да се преобразуват с трансформация арксинус–корен квадратен или с трансформация Freeman-Tukey, за да се получи приблизително нормално разпределение и да се изравнят дисперсиите. По отношение на коефициента на имагиниране може да се използва тестът на Cochran-Armitage, точният тест на Fisher (с корекция на Bonferroni), или тестовете на Mantel-Haenszel при използване на абсолютни честоти. Трансформацията арксинус–корен квадратен се прилага, като се вземе реципрочната стойност на синус ( $\sin^{-1}$ ) от квадратния корен на СИ.
49. Стойностите  $EC_x$  за съотношението на имагиниране се изчисляват с помощта на регресионен анализ (или напр. probit (22), logit, Weibull, подходящо достъпно срещу заплащане програмно осигуряване, и т.н.). Ако регресионният анализ е неуспешен (т.е., ако има по-малко от два частични отговора), използват се други непараметрични методи, напр. плаващо средно или проста интерполация

*Скорост на развитие*

50. Средното време на развитие е средният интервал между въвеждането на ларвите (ден 0 на изпитването) и имагинирането на експерименталната кохорта насекоми. (За изчисляването на действителното време за развитие следва да се вземе предвид възрастта на ларвите в момента на въвеждане). Скоростта на развитие е реципрочна на времето на развитие (единица: 1/ден) и отговаря на частта от развитието на ларвите, която се извършва за един ден. Скоростта на развитие се предпочита в оценката на изследванията на токсичността на седимента, тъй като нейната дисперсия е по-ниска и тя е по-хомогенна и по-близка до нормалното разпределение, отколкото средното време на развитие. Поради това могат да се използват мощни параметрични тестови процедури, в които се използва по-скоро скоростта на развитие, а не времето за развитие. По отношение на скоростта на развитие като непрекъснат отговор, стойностите на  $EC_x$  могат да се оценят с използване на регресионен анализ (напр. (23), (24).
51. В посочените по-долу статистически тестове се приема, че насекомите, наблюдавани в деня за инспекция  $x$ , са достигнали до стадия на имаго в средата на интервала между ден  $x$  и ден  $x-1$  ( $l$  = дължина на периода на инспекция, обикновено един ден). средната скорост на развитие за съд ( $\bar{x}$ ) се изчислява по формулата:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

където:

$\bar{x}$ : средна скорост на развитие за съд

$i$ : индекс на интервала на инспекция

$m$ : максимален брой интервали на инспекция

$f_i$ : брой на насекомите, достигнали до стадий на имаго през интервала на инспекция  $i$

$n_e$ : общ брой на насекомите, достигнали до стадий на имаго в края на експеримента (=  $\sum f_i$ )

$x_i$ : скорост на развитие на насекомите, достигнали до стадий на имаго през интервала на инспекция  $i$

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

където:

$\text{day}_i$ : ден на инспекция (дни след прилагането)

$1_i$ : продължителност на интервала на инспекция (дни, обикновено 1 ден)

**Доклад от изпитването**

52. В доклада от изпитването трябва да се съобщава най-малко следната информация:

*Изпитвано вещество:*

- физична природа и, където е подходящо, физични и химични свойства (разтворимост във вода, парно налягане, коефициент на разпределение в почва (или в седимент, ако такава информация е налице), стабилност във вода, и т.н.),
- данни за идентичността на химикала (общоприето наименование, химично наименование, номер по CAS, и т.н.), включително чистота и метод за анализ за количествено определяне на изпитваното вещество.

*Животински вид за изпитването:*

- използвани в изпитването животни: вид, научно наименование, източник на организмите и условия на отглеждане,
- информация за боравенето с агломератите от яйца и ларвите,
- възраст на използваните животни при въвеждането им в съдовете за изпитване.

*Условия на изпитването:*

- използван седимент, т.е., естествен или приготвен седимент,
- за естествения седимент — местоположение и описание на мястото на вземане на пробата, включително, ако е възможно, информация за замърсяването в миналото; характеристики: рН, съдържание на органичен въглерод, съотношение C/N и зърнометричен състав (ако е подходящо),
- подготовка на синтетичния седимент: съставки и характеристики (съдържание на органичен въглерод, рН, влажност, и т.н. в началото на изпитването),
- подготовка на водата за изпитването (ако се използва възстановена вода) и характеристики на водата (концентрация на кислород, рН, проводимост, твърдост, и т.н. в началото на изследването),
- дълбочина на седимента и на водата над седимента,
- обем на водата над седимента и на водата в порите; тегло на влажния седимент съответно със и без водата в порите,
- съдове за изпитване (материал и размери),
- методи за обогатяване на седимента: използвани концентрации, брой на повторенията и употреба на разтворител, ако има такава употреба,
- равновесна фаза на стабилизация на системата седимент с добавка — вода: продължителност и условия,
- инкубационни условия: температура, редуване на светлина и тъмнина, светлинен интензитет, аериране (периодичност и интензитет),
- подробна информация за храненето, включително вида на храната, приготвянето и режима на хранене.

*Резултати:*

- номинални концентрации на изпитване, измерени концентрации на изпитване, резултати от всички анализи за определяне на концентрацията на изпитваното вещество в съдовете за изпитване,
- качество на водата в съдовете за изпитване, т.е., рН, температура, разтворен кислород, твърдост и амоняк,
- замяна на изпарилата се от съда за изпитване вода, ако има такава,
- брой на достигналите до стадий на имаго мъжки и женски насекоми за съд и за ден,
- брой ларви, недостигнали до стадий на имаго за съд,
- средно индивидуално сухо тегло на ларвите за съд, и за стадий, ако е подходящо,
- процент на достигане до стадий на имаго за повторение и за концентрация на изпитване (общо за мъжките и женските насекоми),

- средна скорост на развитие на достигналите до стадии на имаго насекоми за повторение и за концентрация на изпитване (общо за мъжките и за женските насекоми),
- предварителни оценки на стойностите на крайни точки за токсичността, напр.  $EC_x$  (и свързаните с тях доверителни интервали), LOEC и/или NOEC, както и статистическите методи, използвани за тяхното определяне,
- обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването, вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

ПРЕПРАТКИ:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment № 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Метод за изпитване B.8 от настоящото приложение, Токсичност за червеи
- (15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
  - (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20: 482-491.
  - (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
  - (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
  - (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.
  - (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
  - (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.
  - (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.
-



*Допълнение 1*

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За целите на настоящия метод за изпитване са използвани следните определения:

**Приготвен седимент** или възстановен, изкуствен или синтетичен седимент е смес от материали, използвани за симулиране на физичните съставки на естествения седимент.

**Вода над седимента** е водата, която се намира над седимента в съда за изпитване.

**Интерстициална вода**, или вода от порите е водата, която заема пространството между частиците на почвата и седимента.

**Седимент с добавка** е седимент, към който е добавено изпитваното вещество.

**Изпитван химикал**: всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

---

## Допълнение 2

**Препоръки за отглеждане на *Chironomus riparius***

1. Ларвите на *Chironomus* могат да се отглеждат в кристализатори или в по-големи контейнери. На дъното на контейнера се разпръсква фин кварцов пясък на тънък слой с дебелина 5 до 10 mm. Има информация, че кизелгурът (напр. Merck, арт. 8117) също е подходящ субстрат (достатъчен е по-тънък слой от само няколко mm). След това се добавя подходяща вода до достигане на дълбочина от няколко cm. Долива се вода, ако е необходимо, за да се компенсира загубата от изпаряване и за да се предотврати изсушаването. Водата може да се сменя, ако е необходимо. Следва да се осигури умерено аериране. Съдовете за отглеждане на ларвите следва да се поставят в подходяща клетка, с която да се предотврати отлитането на достигналите до стадий на имаго възрастни насекоми. Клетката следва да бъде с достатъчни размери, за да се даде възможност за оформяне на рой от получените възрастни, защото в противен случай може да не се стигне до копулация (най-малко около 30 × 30 × 30 cm).
2. Клетките следва да се държат при стайна температура или в помещение с постоянни характеристики на средата при 20 ± 2 °C със светъл период от 16 часа (интензитет около 1 000 lux) и 8 часа тъмнина. Докладвано е, че относителна влажност, по-ниска от 60 %, може да възпрепятства размножаването.

**Вода за разреждане**

3. Може да се използва всяка подходяща естествена или синтетична вода. Практиката е да се използва вода от кладенец, чешмяна вода, от която е отстранен хлорът, и изкуствена среда (напр. среда Elendt „M4“ или „M7“). Преди употреба водата трябва да бъде аерирана. Ако е необходимо, водата за отглеждане може да се обновява, като се внимателно се излива или изсмуква използваната вода от съдовете за отглеждане, без да се унищожават тръбичките на ларвите.

**Хранене на ларвите**

4. Ларвите на *Chironomus* трябва да се хранят с храна за риба на люспи (Tetra Min®, Tetra Phyll® или друга подобна търговска марка храна за риба) по около 250 mg на съд дневно. Храната може да се дава като сух смлян прах или като суспензия във вода: 1,0 g храна във вид на люспи се добавя към 20 ml вода за разреждане и се разбърква, за да образува хомогенна смес. Така получената смес може да се дава в количество от около 5 ml на съд дневно (като се разбърква преди употреба). По-старите ларви могат да получават повече храна.
5. Количеството храна се определя съобразно качеството на водата. Ако средата за отглеждане стане мътна, количеството храна трябва да се намали. Добавянето на храна се следи внимателно. Даването на прекалено малко храна ще предизвика миграция на ларвите в обема на водата, а твърде голямо количество ще предизвика засилване на дейността на микробите и по-ниски нива на кислорода. И двете обстоятелства могат да доведат до по-ниска скорост на развитие.
6. Могат също да се добавят и клетки от някои зелени водорасли (напр. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), когато се подготвят нови съдове за отглеждане.

**Хранене на имагинираните възрастни**

7. Някои експериментатори изказват идеята, че тампон от памук, напоен с наситен разтвор на захароза, може да се използва за хранене на достигналите до стадий на имаго възрастни.

**Имагиниране**

8. При температура от 20 °C ± 2 °C след приблизително 13—15 дни от съдовете за отглеждане на ларви ще започнат да имагинират възрастните насекоми. Мъжките лесно се разпознават по това, че имат перести антени.

**Агломерати от яйца**

9. Щом в съдовете за развъждане има наличие на възрастни насекоми, всички съдове за отглеждане трябва да се проверяват три пъти седмично за наличие на желеобразни маси яйца. Ако са налице, масите яйца следва да бъдат внимателно отстранени. Те следва да се преместят в малко блюдо, съдържащо проба от водата за развъждане. Масите яйца се използват за създаване на нов съд за отглеждане (напр. 2—4 маси яйца/съд) или се използват в изпитванията за токсичност.
10. След 2—3 дни следва да се излюпят ларви от първи стадий.

**Създаване на нови съдове за отглеждане**

11. След като е положено началото на отглеждането, следва да е възможно да се създава нов съд за отглеждане на ларви всяка седмица или по-рядко, в зависимост от изискванията на изпитването, като старите съдове се изваждат от изпитването, след като преобразяването на ларвите в имаго завърши. Използването на тази система позволява редовно получаване на възрастни насекоми с минимални грижи за управление.

**Приготвяне на разтвори за изпитване „М4“ и „М7“**

12. Среда „М4“ е описана в Elendt (1990). Среда „М7“ се приготвя като „М4“, освен по отношение на указаните в таблица 1 вещества, при които се използват концентрации, четири пъти по-ниски, отколкото използваните в „М4“. Подготвя се публикация за среда „М7“ (Elendt, лично съобщение). Разтворът за изпитване не трябва да се приготвя според Elendt and Bias (1990) тъй като концентрациите на  $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , посочени за приготвянето на изходния разтвор, не са подходящи.

**Приготвяне на среда „М7“**

13. Всеки изходен разтвор (I) се приготвя отделно и с изходните разтвори (I) се приготвя комбиниран изходен разтвор (II) (вж. таблица 1). За получаване на среда „М7“ 50 ml от комбинирания изходен разтвор (II) и посочените в таблица 2 количества от изходните разтвори на макро храни се допълват до 1 литър с дейонизирана вода. Приготвя се изходен разтвор на витамини, като се добавят трите витамина, както е посочено в таблица 3, към дейонизирана вода, и 0,1 ml от комбинирания изходен разтвор на витамини се добавя към крайната среда „М7“ малко преди употреба. (Стандартният разтвор на витамини се съхранява замразен на малки аликвотни части). Средата се аерира и стабилизира.

**ПРЕПРАТКИ**

BVA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelöke and H.Köpp. Berlin 1995.

Таблица 1

**Изходни разтвори на микроелементи за среди М4 и М7**

Изходни разтвори (I)	Количество (mg), разреждано до 1 l с дейонизирана вода	За приготвянето на комбиниран изходен разтвор (II): смесват се следните количества (ml) от всеки от изходните разтвори (I) и се долива до 1 литър дейонизирана вода		Крайни концентрации в разтворите за изпитване (mg/l)	
		М4	М7	М4	М7
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
$\text{LiCl}$ (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
$\text{RbCl}$ (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
$\text{NaBr}$ (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$\text{ZnCl}_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
$\text{KI}$	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Веществата се различават в М4 и М7, както е посочено по-горе.

(2) Разтворите се приготвят отделно, изливат се заедно и незабавно се автоклавираат.

Таблица 2

## Изходни разтвори на макрохранителни вещества за среди М4 и М7

	Количество, разреждано до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Изходни разтвори на макрохранителни вещества, добавяни за приготвяне на среди М4 и М7 (ml/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване М4 и М7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$\text{NaHCO}_3$	64 800	1,0	64,8
$\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 000	0,2	10,0
$\text{NaNO}_3$	2 740	0,1	0,274
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 430	0,1	0,143
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 840	0,1	0,184

Таблица 3

## Изходни разтвори на витамини за среди М4 и М7. Събират се всички три развора на витамини, за да се приготви един общ изходен разтвор на витамини

	Количество, разреждано до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Количество изходен разтвор на витамини, добавяно за приготвяне на среди М4 и М7 (ml/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване М4 и М7 (mg/l)
Тиаминхидрохлорид	750	0,1	0,075
Цианокобаламин (В12)	10	0,1	0,0010
Биотин	7,5	0,1	0,00075

## ПРЕПРАТКИ

Eldnt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoptasma* 154: 25-33.

Eldnt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

## Допълнение 3

## ПРИГОТВЯНЕ НА СИНТЕТИЧЕН СЕДИМЕНТ

**Състав на седимента**

Съставът на синтетичния седимент е, както следва:

Съставка	Характеристики	Процент от сухото тегло на седимента
Торф	Торф от торфен мъх, с рН възможно най-близо до 5,5—6,0 без видими остатъци от растения и фино смлян (размер на частиците $\leq 1$ mm) и изсушен на въздух	4 – 5
Кварцов пясък	Размер на зърната: > 50 % от частиците следва да бъдат в интервала 50—200 $\mu$ m	75 – 76
Каолин	Съдържание на каолинит $\geq 30$ %	20
Органичен въглерод	Коригира се чрез добавяне на торф и пясък	2 ( $\pm 0,5$ )
Калциев карбонат	CaCO <sub>3</sub> на прах, химически чист	0,05 - 0,1
Вода	Проводимост $\leq 10$ $\mu$ S/cm	30 - 50

**Приготвяне**

Торфът се изсушава с въздух и се смля на фин прах. Приготвя се суспензия от желаното количество торф на прах в дейонизирана вода, като се използва високопроизводително хомогенизиращо устройство. Като се използва CaCO<sub>3</sub>, рН на суспензията се коригира до  $5,5 \pm 0,5$ . Суспензията се аклиматизира най-малко два дни при  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , като се разбърква леко, за да се стабилизира рН и да се създаде стабилна микробна среда. Отново се измерва рН, което трябва да бъде  $6,0 \pm 0,5$ . След това торфената суспензия се смесва с другите съставки (пясък и каолин) и дейонизирана вода, за да се получи хомогенен седимент със съдържание на вода в интервала 30—50 % от сухото тегло на седимента. Измерва се отново рН на крайната смес и, ако е необходимо, се коригира до 6,5—7,5 с CaCO<sub>3</sub>. Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и съдържанието на органичен въглерод. Освен това, препоръчва се преди използването му в изпитване за токсичност за хирономиди, изкуственият седимент да бъде аклиматизиран в продължение на седем дни при същите условия, при които ще се провежда изпитването.

**Съхранение**

Сухите съставки за приготвянето на изкуствения седимент могат да се съхраняват в сухо и хладно място при стайна температура. Приготвеният (влажен) седимент не трябва да се съхранява преди употребата му в изпитване. Той следва да се употребява незабавно след 7-дневния период за аклиматизация, с който завършва приготвянето му.

**ПРЕПРАТКИ**

Глава В.8 от настоящото приложение, Токсичност за земни червеи.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

## Допълнение 4

## Химични характеристики на приемлива вода за разреждане

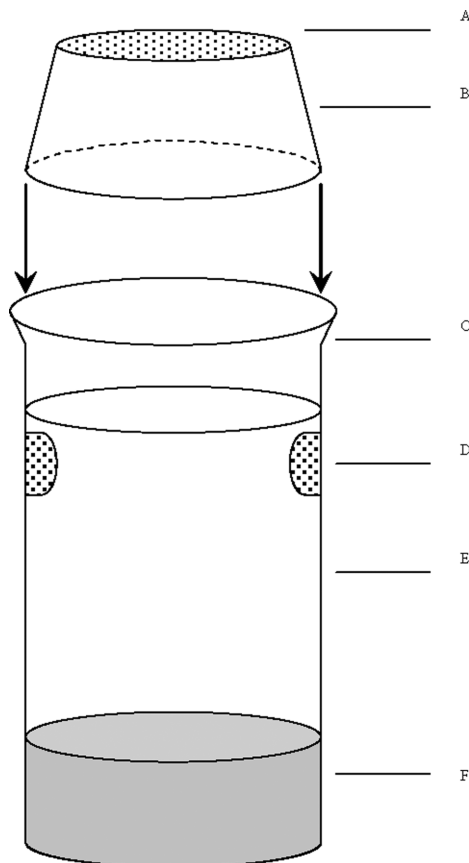
Вещество	Концентрации
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Твърдост, изразена като CaCO <sub>3</sub>	< 400 mg/l (*)
Остатъчен хлор	< 10 µg/l
Общо органофосфорни пестициди	< 50 ng/l
Общо органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили	< 50 ng/l
Общ органичен хлор	< 25 ng/l

(\*) Трябва обаче да се отбележи, че ако се предполага взаимодействие между йоните, от които произтича твърдостта, и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt M4“).

## Допълнение 5

## Насоки за наблюдение на имагинирането на ларвите на хириномидите

Върху бехеровите чаши, в които се провежда изпитването, се поставят уловители за достигнали до стадия на имаго насекоми. Уловителите са необходими от 20-ия ден на изпитването до края му. Примерно устройство на уловителя е показано по-долу:



- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| A: найлонов екран               | D: екранирани отвори за смяна на водата |
| B: обърнати пластмасови панички | E: вода                                 |
| C: чаша за експозиция без улей  | F: седимент                             |

#### В. 28. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ВОДА С ДОБАВКА

##### УВОД

- Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на ОИСП TG 219 (2004). Настоящият метод за изпитване е предназначен за оценка на въздействието на продължителната експозиция на химикали на живеещи в седимента ларви на пресноводното двукрило *Chironomus* sp. Методът се основава основно на насоките за изпитване на ВВА с използване на изпитвателна система седимент-вода с изкуствена почва и сценарий на експозиция чрез водния обем (1). Методът също така взема под внимание съществуващите протоколи за изпитвания на токсичността за *Chironomus riparius* и *Chironomus tentans*, разработени в Европа и Северна Америка (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) и подложени на кръгово изпитване (1)(6)(9). Могат да се използват и други добре документирани видове хириномиди, напр. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).
- Сценарият за експозиция, който се използва в настоящия метод за изпитване, е добавяне към вода на изпитвано вещество. Изборът на подходящ сценарий за експозиция зависи от предвиденото приложение на изпитването. Със сценария с експозиция чрез водата, при който добавката е към водата над седимента, се цели да се симулира разнасяне на пестицид и обхваща началната пикова стойност на концентрациите във водата в порите. Той е полезен също и за други типове експозиция (в това число разливане на химикали), освен процесите на натрупване, които продължават по-дълго от времетраенето на изпитването.

3. Веществата, които трябва да бъдат изпитани с помощта на организми, живеещи в седимента, обикновено са задържат в тази естествена среда за дълги периоди от време. Живеещите в седимента организми могат да бъдат засегнати по различни начини. Относителната важност на всеки път на експозиция и времето, необходимо за всеки от тях да способства за общото токсично въздействие, зависят от физико-химичните свойства на съответния химикал. За силно адсорбиращите химикали (напр. с  $\log K_{ow} > 5$ ) или за вещества, които образуват ковалентна връзка със седимента, поглъщането на замърсена храна може да бъде значим път на експозиция. За да не се подцени токсичността на силно липофилните вещества, може да се разгледа възможността за добавяне на храна в седимента, преди да бъде приложено изпитваното вещество. За да се вземат предвид всички възможни пътища на експозиция, настоящият метод за изпитване е ориентиран главно към експозицията в дългосрочен план. Продължителността на изпитването е от 20 до 28 дни за *C. riparius* и *C. yoshimatsui* и 28—65 за *C. tentans*. Ако за определена специфична цел се изискват данни в краткосрочен план, за да се изследва например въздействието на нестабилни химикали, допълнителните повторения, включени в изпитването, могат да се прекратят след период от десет дни.
4. Измерваните крайни точки са общият брой на имагиниралите възрастни насекоми и времето, което е изтекло до достигането на стадия на имаго. Ако са необходими допълнителни данни в краткосрочен план, препоръчва се измерването на преживяването и растежа на ларвите да се извършва едва след десетдневен период, като се използват, ако е необходимо, допълнителни повторения.
5. Препоръчва се употребата на приготвен седимент. Приготвеният седимент има някои преимущества пред естествените седименти:
  - намалява се експерименталното вариране, тъй като приготвеният седимент играе ролята на „стандартна матрица“ и отпада необходимостта да се намират източници на незамърсен и чист седимент,
  - изпитванията могат да започнат по всяко време, без да се влияят от сезонната променливост на включения в изпитването седимент, и без да се налага седиментът да се подлага на предварителна подготовка за отстраняване на собствена му фауна; използването на приготвен седимент намалява и разходите във връзка със събирането в полеви условия на достатъчно количество седимент за рутинните изпитвания,
  - използването на приготвен седимент позволява сравняване на токсичността и съответно подреждане на веществата: за много химикали данните за токсичността от изпитвания с естествени и с изкуствени седименти са съпоставими (2).
6. Определенията, които са използвани, са дадени в допълнение 1.

#### ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

7. Ларви на хириномиди в първи ларвен стадий се излагат на обхват от концентрации на изпитваното вещество в системи седимент — вода. Изпитването започва с въвеждането на ларви в първи ларвен стадий в изпитвателните бехерови чаши, съдържащи системата седимент — вода, и добавяне по-късно на изпитваното вещество във водата. В края на изпитването се измерва имагинирането на хириномидите и скоростта им на развитие. Може също да се измери и преживяването и теглото на ларвите след 10 дни, ако е необходимо (като се използват допълнителни повторения, както е подходящо). Данните се анализират, като се използва регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която предизвиква намаляване с  $x$  % на имагинирането или на преживяването на ларвите или растежа им (напр.  $EC_{15}$ ,  $EC_{50}$  и т.н.) или като се използва проверка на статистическа хипотеза за определяне на  $NOEC/LOEC$ . Последното изисква сравнение на стойностите, при които се наблюдава въздействие, с контролните стойности, като се използват статистически тестове.

#### ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОВОТО ВЕЩЕСТВО

8. Разтворимостта във вода и налягането на парите на изпитваното вещество, измереното или изчисленото му разпределение в седимента и стабилността му във вода следва да са известни. Следва да е на разположение и надежден метод за анализ за количествено определяне на веществото във водата над седимента, водата в порите и седимента, чиито точност и граница на откриваемост са известни и отчетени. Ползена информация са структурната формула и чистотата на изпитваното вещество. Информация за химическата трансформация на изпитваното вещество (разсейване, абиотично и биотично разграждане и т.н.) също е полезна. Допълнителни насоки за изпитване на вещества с физикохимични свойства, които ги правят трудни за изпитване, са дадени в (12).

#### РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

9. Референтните химикали може да се изпитват периодично като средство за потвърждение, че протоколът за изпитване и условията на изпитване са надеждни. Могат да се посочат като пример следните референтни токсични вещества, използвани успешно в кръгови изпитвания и в изследвания за потвърждаване: линдан, трифлуралин, пентахлорфенол, кадмиев хлорид и калиев хлорид (1)(2)(5)(6)(13).

#### ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

10. За да е валиден тестът, прилагат се следните условия:

— в края на изпитването имагинирането в контролните експерименти трябва да бъде поне 70 % (1)(6),



- имажинирането на *C. riparius* и *C. yoshimatsui* в контролните съдове трябва да настъпва между 12 и 23 дни след въвеждането им в съдовете; за *C. tentans* е необходим период от 20 до 65 дни,
- в края на изпитването следва да се измери рН и концентрацията на разтворения кислород във всички съдове. Концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде поне 60 % от стойността на насищане на въздуха при използваната температура, а рН на водата над седимента следва да бъде в обхвата 6—9 във всички съдове, в които се извършва изпитването,
- температурата на водата не трябва да варира с повече от  $\pm 1$  °C и може да се контролира в изотермично помещение, като в този случай температурата трябва да се потвърждава на подходящи интервали.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Съдове за извършване на изпитването

11. Изпитването се извършва в стъклени бежероци чаши с вместимост 600 ml и диаметър 8 cm. Подходящи са и други съдове, но те следва да осигуряват подходяща дълбочина на водата над седимента и на самия седимент. Площта на седимента трябва да бъде достатъчна, за да осигурява 2 до 3 cm<sup>2</sup> на ларва. Съотношението между дебелината на слоя седимент и тази на водата над него трябва да бъде 1:4. Съдовете за изпитване и другото оборудване, което ще влезе в контакт с изпитваната система, следва да бъде изцяло от стъкло или от друг химически инертен материал (напр. тефлон).

##### Избор на видове

12. Видът, който трябва да се използва при изпитването, е за предпочитане *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* също е подходящ, но с него се борави по-трудно и е необходим по-дълъг период на изпитване. *Chironomus yohimatsui* също може да бъде подходящ. Подробностите за методите на отглеждане на *Chironomus riparius* са дадени в допълнение 2. Налична е и информация за условията на отглеждане на други видове, т.е. *Chironomus tentans* (4) и *Chironomus yohimatsui* (11). Идентичността на видовете трябва да се потвърждава преди изпитването, но не е задължителна преди всеки експеримент, ако организмите са получени при отглеждане в изпитващата лаборатория.

##### Седимент

13. За предпочитане е да се използва приготвен седимент (наричан още възстановен, изкуствен или синтетичен седимент). Ако обаче се използва естествен седимент, трябва да се определят характеристиките му (най-малко рН и съдържание на органичен въглерод, а определянето на други параметри, напр., на съотношението C/N и зърнометричния състав, също се препоръчва), той следва да бъде незамърсен и в него да няма други организми, които да се конкурират с хириномидите, или да се хранят с тях. Препоръчва се също така, преди използването му в изпитване за токсичност за хириномиди, естественият седимент да бъде аклиматизиран в продължение на седем дни при същите условия, при които ще се провежда изпитването. За използване в описаното тук изпитване се препоръчва следният седимент (1)(15)(16), приготвен въз основа на изкуствената почва, използвана в метод за изпитване V.8 (14):
  - а) 4—5 % торф (сухо тегло); с рН възможно най-близко до обхвата 5,5—6,0; важно е да се използва торф под формата на прах, ситно смлян (размер на частиците < 1 mm) и изсушен само с въздух;
  - б) 20 % каолин (сухо тегло) (за предпочитане съдържанието на каолинит да е повече от 30 %);
  - в) 75—76 % кварцов пясък (сухо тегло) (трябва да преобладава финият пясък с размер на частиците между 50 и 200  $\mu$ m);
  - г) добавя се дейонизирана вода, така че да влажността на крайната смес да бъде в обхвата 30—50 %;
  - д) добавя се химически чист калциев карбонат (CaCO<sub>3</sub>), за да се коригира рН на крайната смес на седимента до  $7,0 \pm 0,5$ ;
  - е) съдържанието на органичен въглерод в крайната смес следва да бъде 2 % ( $\pm 0,5$  %) и да бъде коригирано, като се използват подходящи количества торф и пясък, в съответствие с а) и в).
14. Източниците на торф, каолин и пясък трябва да са известни. Съставките на седимента следва да се проверят за липса на химическо замърсяване (напр. тежки метали, органични хлорни съединения, органични фосфорни съединения и т.н.). Пример за приготвянето на синтетичния седимент е даден в допълнение 3. Допустимо е също и смесването на сухи съставки, ако се докаже, че след добавянето на надседиментната вода не настъпва разделяне на съставките (напр. изплуване на торфените частици), и че торфът или седиментът е подготвен в необходимата степен.

**Вода**

15. Всяка вода, която отговаря на химичните характеристики за вода, приемлива за използване за разреждане, както са изброени в допълнение 2 и 4, е подходяща да се използва като вода за изпитването. Всяка подходяща вода, природна вода (от повърхностни или подпочвени води), реконституирана вода (вж. допълнение 2) или дехлорирана чешмяна вода може да се използва за отглеждане и за изпитване, ако хириномидите оцеляват в нея за времето на отглеждане и изпитване, без да показват признаци на стрес. В началото на изпитването рН на водата за изпитване трябва да бъде между 6 и 9, а общата ѝ твърдост — не по-висока от 400 mg/l, изразена като CaCO<sub>3</sub>. Ако обаче се предполага взаимодействие между отговорните за твърдостта йони и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt M4“). По време на цялото изпитване трябва да се използва един и същи тип вода. Качествените параметри на водата, изброени в допълнение 4, следва да се измерват поне два пъти годишно или всеки път когато има подозрение, че тези характеристики може да са се променили значително.

**Изходни разтвори — вода с добавка**

16. Концентрациите, при които се прави изпитването, се изчисляват въз основа на концентрациите в обема на водата, т.е., водата над седимента. Разтворите с избраните концентрации, които ще се ползват в изпитването, обикновено се приготвят чрез разреждане на изходния разтвор. Изходните разтвори се приготвят за предпочитане чрез разтваряне на изпитваното вещество в изпитвателната среда. В някои случаи може да се наложи да се използват разтворители или диспергиращи агенти, с цел да се получи изходен разтвор с подходяща концентрация. Като подходящи разтворители могат да се посочат: ацетон, етанол, метанол, моноетилов етер на етиленгликола, диметилов етер на етиленгликола, диметилформамид и триетиленгликол. Като диспергиращи агенти могат да се използват Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. Когато се използва подпомагач разтварянето агент, неговата концентрация не трябва да е по-голяма от 0,1 ml/l и трябва да бъде една и съща във всички съдове. Когато се използва подпомагач разтварянето агент, той не трябва да оказва значително въздействие върху преживяването, нито видимо неблагоприятно въздействие върху ларвите на хириномидите, като това трябва да е показано с помощта на контролен експеримент само с разтворител. Въпреки това, следва да се положат всички усилия, за да се избегне употребата на такива материали.

**ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

17. Планирането на изпитването се изразява в избор на броя на стойностите на концентрацията на изпитване и интервалите между тези стойности, броя на съдовете за всяка концентрация и броя на ларвите във всеки съд. Описани са плановете на изпитване за определяне на концентрацията на въздействие ЕС, за определяне на NOEC и за провеждане на гранично изпитване. Регресионният анализ е за предпочитане пред подхода, основан на проверка на хипотези.

*Планиране на регресионния анализ*

18. Концентрацията, при която се проявява въздействие (напр. ЕС<sub>15</sub>, ЕС<sub>50</sub>) и интервалът концентрации, над които въздействието на изпитваното вещество е от значение, следва да бъдат обхванати от концентрациите, включени в изпитването. По принцип точността, и по-специално валидността, с която може да се направи оценка на стойностите на концентрацията на въздействие (ЕС<sub>x</sub>), се повишава, когато концентрацията на въздействие е в обхвата на изпитваните стойности на концентрацията. Следва да се избягват екстраполации за стойности, много по-ниски от най-ниската концентрация на въздействие или по-високи от най-високата концентрация. За избора на интервал от концентрации, които да се изпитат, е полезно да се извърши предварително изпитване за определяне на обхвата (вж. точка 27).

19. Ако трябва да се направи оценка на ЕС<sub>x</sub>, следва да се направи изпитване при най-малко пет концентрации и три повторения за всяка концентрация. Във всички случаи, препоръчва се да се използва достатъчно стойности на концентрациите на изпитване, за да е възможна удовлетворителна оценка чрез модела. Коэффициентът, с чиято помощ се получава следващата концентрация, не бива да бъде по-голям от две (може да се направи изключение в случаите, в които графиката на зависимостта на реакцията от дозата има твърде слаб наклон). Броят на повторенията за всяко третиране може да се намали, ако броят на изпитваните концентрации, които предизвикват различна реакция, се увеличи. Увеличаването на броя на повторенията или съкращаването на интервала между концентрациите обикновено води до стесняване на доверителния интервал на изпитването. Ако трябва да се направи оценка на преживяването и растежа на ларвите, необходими са допълнителни повторения.

*Планиране на изпитване за оценка на NOEC/LOEC*

20. Ако трябва да се оценят NOEC/LOEC, следва да се направи изпитване при пет концентрации и с най-малко четири повторения, а коэффициентът между стойностите на концентрациите не бива да е по-голям от две. Броят на отделните повторения следва да е достатъчен за осигуряване на достатъчно статистическа мощност за откриване на разлика от 20 % по отношение на контролата при равнище на значимост от 5 % ( $p = 0,05$ ). По отношение на скоростта на развитие, обикновено е подходящо да се предприеме дисперсионен анализ (ANOVA), напр., тест на Dunnett и тест на Willams (17)(18)(19)(20). По отношение на коефициента на имагиниране може да се използва тестът на Cochran-Armitage, точният тест на Fisher (с корекция на Bonferroni), или тестът на Mantel-Haenszel.

*Гранично изпитване*

21. Може да се предприеме гранично изпитване (с една концентрация за изпитване и една контрола), ако не е наблюдавано въздействие в предварителното изпитване за определяне на обхвата. Предназначението на граничното изпитване е да се покаже, че стойността, при която изпитваното вещество има токсично въздействие, е по-висока от изпитаната гранична стойност на концентрацията. Не е възможно да се препоръча някаква определена стойност на концентрацията в рамките на настоящия метод за изпитване, това се оставя на преценката на регулаторния орган. Обикновено са необходими най-малко шест повторения както на третираните проби, така и на контролата. Следва да се докаже достатъчно статистическа мощност за откриване на разлика от 20 % по отношение на контролата при равнище на значимост от 5 % ( $p = 0,05$ ). По отношение на метричния отговор (скорост на развитие и тегло), t-тестът е подходящ статистически метод, ако данните отговарят на изискванията на изпитването (нормалност, хомогенни дисперсии). Може да се използва и t-тест с нееднаква дисперсия или непараметричен тест, напр. тест на Wilcoxon-Mann-Whitney, ако изискванията не са изпълнени. По отношение на коефициента на имагиниране, точният тест на Fisher е подходящ.

## ПРОЦЕДУРА

**Условия на експозиция***Приготвяне на системата вода с добавка — седимент*

22. Подходящи количества приготвен седимент (вж. точки 13—14 и допълнение 3) се слагат в съдовете за изпитване, така че да се образува слой от около 1,5 cm. Добавя се вода до 6 cm (вж. точка 15). Съотношението между дебелината на слоя седимент и тази на водата трябва да не надвишава 1:4, а слойт седимент не трябва да бъде по-дебел от 3 cm. Системата седимент — вода трябва да се остави, при леко аериране, седем дни, преди да бъдат добавени опитните организми (вж. точка 14 и допълнение 3). За да се избегне разделяне на съставките на седимента и повторно суспендиране във водата на фините частици при добавянето на водата за изпитването, седиментът може да се покрие със пластмасов диск, докато се налива водата, веднага след което дискът да се извади. Могат да бъдат подходящи и други устройства.
23. Съдовете за изпитването следва да бъдат покрити (напр. със стъклени пластинки). Ако е необходимо, по време на изследването съдовете се допълват до първоначалния обем, за да се компенсира изпаряването на водата. Това следва да се извърши, като се използва дестилирана или дейонизирана вода, за да се избегне образуването на соли.

*Добавяне на опитните организми*

24. Четири до пет дни преди добавянето на опитните организми в съдовете за изпитване, агломератите от яйца следва да се извадят от културите и да се сложат в малки съдове в среда за отглеждане. Може да се използва зряла среда от онази, в която е отглеждана изходната култура, или прясно приготвена среда. Ако се използва такава, към нея се добавя малко количество храна, т.е., зелени водорасли и/или няколко капки филтрат от суспензия от фино смляна храна за риби (вж. допълнение 2). Следва да се използват само прясно снесени агломерати от яйца. Като правило, ларвите започват да се излюпват няколко дни след снасянето на яйцата (2 до 3 за *Chironomus riparius* при 20 °C, 1 до 4 за *Chironomus tentans* при 23 °C и *Chironomus yohimatsui* при 25 °C, а растежът на ларвите преминава през четири стадия, всеки от които трае от 4 до 8 дни. В изпитването се следва да се използват ларви в първи стадий на развитие (2—3 или 1—4 дни след излюпване). Стадият на развитие на насекомите може да се провери чрез проверка на широчината на капсулата на главата (6).
25. Двадесет ларви в първи ларвен стадий се разпределят на случаен принцип във всеки съд за изпитване, който съдържа седимент с добавка и вода, като се използва пипета с тъп край. Аерирането на водата трябва да се спре, когато ларвите се добавят в съдовете за изпитване, и да не се подновява преди изтичането на 24 часа след добавянето (вж. точки 24 и 32). В зависимост от използвания протокол за изпитване (вж. точки 19 и 20), броят на ларвите, използвани за всяка концентрация е най-малко 60 за оценка на стойността на ЕС и 80 за определяне на NOEC.
26. Двадесет и четири часа след добавянето на ларвите, изпитваното вещество се добавя във водата над седимента и отново се прилага леко аериране. Малки обеми от разтворите на изпитваното вещество се въвеждат под повърхността на водата, като се използва пипета. След това водата над седимента се разбърква леко, като се внимава седиментът да остане незасегнат.

*Концентрации на изпитване*

27. За определяне на интервала от концентрации за окончателното изпитване може да бъде от полза извършването на изпитване за определяне на обхвата. За тази цел се използва серия от много раздалечени концентрации на изпитваното вещество. За да се осигури гъстота на хириномиди на повърхността, еднаква с използваната в същинското изпитване, хириномидите се експонират на всяка една концентрация на изпитваното вещество за период, който позволява оценка на подходящите концентрации за изпитването, като не са необходими повторения.
28. Концентрациите за същинското изпитване се определят въз основа на резултата на изпитването за определяне на обхвата. Следва да се използват най-малко пет концентрации, които се избират, както е описано в точки 18—20.

*Контролни съдове*

29. В изпитването трябва да се включи и съответният брой контролни съдове без изпитвано вещество, но със седимент (вж. точки 19—20), като се предвиди съответният брой повторения. Ако за прилагането на изпитваното вещество е използван разтворител (вж. точка 16), следва да се добави и контролен съд със седимент с разтворител.

*Системи за изпитване*

30. Използват се статични системи. Могат да се използват и полустатични системи или такива с периодично или непрекъснато обновяване на водата над седимента в изключителни случаи, например, когато спецификациите на качеството на водата станат неподходящи за организма, с който се провежда изпитването, или когато се нарушава химическото равновесие (напр. нивото на разтворения кислород е твърде ниско, концентрацията на продукти от екскреция е прекалено висока, или от седимента се просмукват минерали и влияят на стойността на рН и/или твърдостта на водата). Въпреки това, други методи за подобряване на качеството на водата над седимента, като напр. аериране, обикновено са достатъчни и са за предпочитане.

#### Храни

31. Необходимо е да се хранят ларвите, за предпочитане всеки ден или най-малко три пъти седмично. Храна за риби (суспензия във вода или фино смляна храна, напр. Tetra-Min или Tetra-Phyll; вж. подробности в допълнение 2) в количество по 0,25—0,5 mg (0,35—0,5 mg за *C. yoshimatus*) на ларва на ден изглежда подходяща за млади ларви в първите 10 дни. За по-възрастни ларви е необходима малко повече храна. 0,5—1 mg за ларва дневно трябва да е достатъчно за оставащото време на изпитването. Дажбата храна на всички опитни и контролни организми следва да се намали, ако е забелязано развитие на гъбички, или ако сред контролните организми има смъртност. Ако е невъзможно да се спре развитието на гъбички, изпитването трябва да се повтори, когато се изпитват силно адсорбиращи вещества (напр. с  $\log K_{ow} > 5$ ) или вещества, които се свързват ковалентно със седимента, количеството храна, необходима за гарантиране на оцеляването и нормалното развитие на организмите може да се добави към приготвения седимент преди периода на стабилизация. За тази цел вместо храна за риби трябва да се използва растителна материя, например да се добавят 0,5 % (сухо тегло) фино смлени листа от коприва (*Urtica dioica*), черница (*Morus alba*), бяла детелина (*Trifolium repens*), спанак (*Spinacia oleracea*) или друг растителен материал (*Cerophyl* или алфа-целулоза).

#### Условия за инкубиране

32. Водата над седимента в съдовете за изпитване леко се аерира, за предпочитане 24 часа след добавянето на ларвите, като аерирането продължава през цялото време на изпитването (следва да се вземат мерки концентрацията на разтворения кислород да не пада под 60 % от стойността на насищане във въздух). Аерирането се осъществява с помощта на стъклена пипета „Пастър“, закрепена на 2—3 cm над слоя седимент (едно или няколко мехурчета в секунда). Когато се изпитват летливи химикали, следва се внимава да не се аерира системата седимент-вода.
33. Изпитването се провежда при постоянна температура 20 °C ( $\pm 2$  °C). Препоръчаните за *C. tentans* и *C. yoshimatus* температури са съответно 23 °C и 25 °C ( $\pm 2$  °C). Продължителността на излагане на светлина е 16 часа, а интензитетът на светлината трябва да бъде между 500 и 1 000 lux.

#### Продължителност на експозицията

34. Експозицията започва с поставянето на ларвите в съдовете с изпитваното вещество и в контролните съдове. Максималната продължителност на експозицията е 28 дни за *C. riparius* и *C. yoshimatus* и 65 за *C. tentans*. Ако насекомите имагинират по-рано, изпитването може да се прекрати след най-малко пет дни след имагинирането на последното възрастно насекомо в контролните съдове.

#### НАБЛЮДЕНИЯ

##### Имагиниране

35. Определя се времето на развитие и общият брой на напълно имагинирани мъжки и женски насекоми. Мъжките лесно се разпознават по перестите си антени.
36. Съдовете за изпитване се наблюдават най-малко три пъти седмично, за да се оцени визуално дали не е налично ненормално по отношение на контролите поведение (напр. напускане на седимента, необичайно плуване). През периода, когато се очаква имагинирането на насекомите, е необходимо ежедневно броене на имагинираните индивиди. Полът и броят на напълно имагинираните насекоми се записва всеки ден. След разпознаване, насекомите се изваждат от съдовете. Всички яйца, снесени преди завършването на изпитването, се записват и изваждат, за да се предотврати повторно въвеждане на ларви в седимента. Броят на видимите пашкули, които не са имагинирани, също се записва. В допълнение 5 са далени насоки за измерването на имагинирането.

##### Растеж и преживяване

37. Ако трябва да се получат данни за преживяването и растежа на ларвите след 10-ия ден, в началото на изпитването в него се включват допълнителни съдове за изпитване, така че да могат да бъдат използвани по-късно. Седиментът от допълнителните съдове се пресява през сито с размер на отворите 250  $\mu$ m, за да се задържат ларвите. Критериите за смърт са неподвижност или липса на реакция спрямо механичен стимул. Липсващите ларви също се смятат за мъртви (ларвите, които са умрели в началото на изпитването може да са били разградени от микроби). Определя се сухото тегло (без пепел) на оцелелите ларви за опитен съд и се изчислява средното индивидуално сухо тегло за съд. Полезно е да се определи на кой стадий на развитие се намират ларвите; за целта може да се използва широчината на капсулата на главата на всеки индивид.

#### Аналитични измервания

##### Концентрация на изпитваното вещество

38. Като минимум следва да се анализират проби от водата над седимента, водата от порите и от седимента в началото (за предпочитане един час след прилагането на изпитваното вещество) и в края на изпитването при най-високата концентрация и при по-ниска такава. Посоченото определяне на концентрацията на изпитваното вещество дава информация за трансформациите/разпределението му в системата вода-седимент. Вземането на проби от седимента

в началото на изпитването може да окаже влияние върху изпитваната система (напр. посредством изваждането на ларви, предназначени за изпитването), поради което в началото на изпитването и по време на самото изпитване (вж. точка 39) за извършване на аналитично определяне трябва да се използват допълнителни съдове. Анализването на седимента може да не се окаже необходимо, ако разпределението на изпитваното вещество между водата и седимента е еднозначно определено с изследване на водата/седимента при сходни условия (напр. съотношение на седимента към водата, вид на прилагането, съдържание на органичен въглерод на седимента).

39. Когато се правят междинни измервания (напр. на 7-ия ден) и ако анализът изисква големи проби, които не могат да се вземат от лабораторните съдове, без да се повлияе върху системата за изпитване, аналитичните определяния следва да се извършват върху проби от допълнителните съдове за изпитване, които са третирани по същия начин (включително присъствието на организми за изпитването), но които не се използват за биологични наблюдения.
40. За изолиране на интерстициалната вода се препоръчва центрофугиране при 10 000 g и 4 °C в продължение на 30 min. Ако обаче изпитваното вещество не се адсорбира от филтрите, филтруването също е приемливо. В някои случаи не е възможно да се анализират концентрациите във водата от порите, тъй като пробата е с много малък размер.

#### Физични и химични характеристики

41. pH, концентрацията на разтворения кислород във водата за изпитване и температурата на съдовете за изпитване следва да се измерват по подходящ начин (вж. точка 10). Твърдостта и амонякът се измерват в контролните съдове и в един съд за изпитване при най-високата концентрация в началото и в края на изпитването.

#### ДАНИ И ОТЧИТАНЕ

##### Обработка на резултатите

42. Целта на настоящото изпитване е да се определи въздействието на изпитваното вещество върху скоростта на развитие и общия брой на достигналите до стадий на имаго мъжки и женски хириноиди, а при 10-дневното изпитване – въздействието върху преживяването и теглото на ларвите. Ако няма указания, че съществуват статистически значими различия между половете по отношение на чувствителността към изпитваното вещество, резултатите за мъжките и женските индивиди могат да се обединят за целите на статистическия анализ. Разликите в чувствителността между половете могат да се оценят статистически с помощта напр. на табличния критерий  $\chi^2 \cdot r \times 2$ . Преживяването на ларвите и средното индивидуално сухо тегло за всеки съд може да се определи след 10 дни, когато това се изисква.
43. Концентрациите, оказващи въздействие, изразени като концентрации във водата над седимента, се изчисляват за предпочитане въз основа на измерените концентрации в началото на изпитването (вж. точка 38).
44. За да се изчисли конкретна прогнозна стойност на  $EC_{50}$  или всяка друга стойност  $EC_x$ , статистическите данни за всеки съд може да се използват като истински повторения. При изчисляването на доверителния интервал за всяка стойност на  $EC_x$ , трябва да се вземе предвид варирането между съдовете, или трябва да се покаже, че то е толкова малко, че може да се пренебрегне. Когато моделът е коригиран с помощта на метода на най-малките квадрати, трябва да се приложи трансформация към статистическите данни за съд, за да се подобри хомогенността на дисперсията. Стойностите обаче на  $EC_x$  следва да се изчисляват след като резултатите се преобразуват обратно в изходни стойности.
45. Когато със статистическия анализ се цели определяне на NOEC/LOEC чрез проверка на хипотези, дисперсията между съдовете трябва да се взема под внимание, напр. с помощта на „вложена“ ANOVA. Напротив, при ситуации, в които са налице нарушения на обичайните допускания на ANOVA, може да се окажат полезни по-мощни критерии (21).

##### Съотношение на имагиниране

46. Стойностите на съотношението на имагиниране (СИ) са данни с две възможни алтернативни значения и могат да се анализират с теста на Cochran-Armitage, който се прилага регресивно, когато се очаква монотонна зависимост между дозата и отговора, а тези данни потвърждават очакванията. В противен случай може да се използва точният тест на Fisher или тестът на Mantel-Haenszel с коригирани по Bonferroni-Holm p-стойности. Ако между повторения при една и съща концентрация са налице данни за по-голямо вариране, отколкото би показало биномно разпределение (често наричано „екстра биномна“ вариация), се прилага устойчив тест на Cochran-Armitage или точен тест на Fisher, както се предлага в (21).
47. Сборът от достигналите до стадий на имаго насекоми на съд, не се определя и се разделя на броя на въведените ларви  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

където:

$ER$  = съотношение на имагиниране

$n_e$  = брой на достигналите до стадий на имаго насекоми на съд

$n_a$  = брой на въведените ларви на съд

48. Алтернативното решение, което е най-пригодно за големи извадки, когато е налице екстра биномна дисперсия, е да се третира съотношението на имагиниране като непрекъснат отговор и да се използват процедури като тест на William, когато се очаква монотонна зависимост между дозата и отговора и тя съответства на тези данни за съотношението на имагиниране. Когато е нарушена монотонността, подходящ е тестът на Dunnett. Като голяма извадка тук се определя такава, при която броят както на имагинираните, така и на неимагинираните хириномиди надвишава пет за всяко повторение (съд).
49. За да се приложат методите на ANOVA, стойностите на СИ трябва първо да се преобразуват с трансформация арксинус–корен квадратен или трансформация на Freeman-Tukey, за да се получи приблизително нормална дистрибуция и да се изравнят дисперсиите. По отношение на коефициента на имагиниране може да се използва тестът на Cochran-Armitage, точният тест на Fisher (с корекция на Bonferroni), или тестът на Mantel-Haenszel при използване на абсолютни честоти. Трансформацията арксинус–корен квадратен се прилага, като се вземе реципрочната стойност на синус ( $\sin^{-1}$ ) от квадратния корен на СИ.
50. Стойностите  $EC_x$  за съотношението на имагиниране се изчисляват с помощта на регресионен анализ (или напр. probit (22), logit, Weibull, подходящо достъпно срещу заплащане програмно осигуряване, и т.н.). Ако регресионният анализ е неуспешен (т.е., ако има по-малко от два частични отговора), използват се други непараметрични методи, напр. плаващо средно или проста интерполация

#### Скорост на развитие

51. Средното време на развитие е средният период между въвеждането на ларвите (ден 0 на изпитването) и имагинирането на експерименталната кохорта от насекоми. (За изчисляването на действителното време за развитие следва да се вземе предвид възрастта на ларвите в момента на въвеждане). Скоростта на развитие е реципрочна на времето на развитие (единица: 1/ден) и отговаря на частта от развитието на ларвите, която се извършва за един ден. Скоростта на развитие се предпочита в оценката на изследванията на токсичността на седимента, тъй като нейната дисперсия е по-ниска, и тя е по-хомогенна и по-близка до нормалното разпределение, отколкото средното време на развитие. Поради това могат да се използват мощни параметрични тестови процедури, в които се използва скоростта на развитие, а не времето за развитие. По отношение на скоростта на развитие като непрекъснат отговор, стойностите на  $EC_x$  могат да се оценят с използване на регресионен анализ (напр. (23), (24)).
52. В посочените по-долу статистически тестове се приема, че насекомите, наблюдавани в деня за инспекция  $x$ , са достигнали до стадия на имаго в средата на интервала между ден  $x$  и ден  $x-1$  ( $l$  = дължина на периода на инспекция, обикновено един ден). средната скорост на развитие за съд ( $x$ ) се изчислява по:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

където:

$\bar{x}$ : средна скорост на развитие за съд

$i$ : индекс на периода на инспекция

$m$ : максимален брой периоди на инспекция

$f_i$ : брой на насекомите, достигнали до стадий на имаго през периода на инспекция  $i$

$n_e$ : общ брой на насекомите, достигнали до стадий на имаго в края на експеримента (=  $\sum f_i$ )

$x_i$ : скорост на развитие на насекомите, достигнали до стадий на имаго през интервала на инспекция  $i$

$$x_i = 1 / \left( \text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

където:

$\text{day}_i$ : ден на инспекция (дни след прилагането)

$l_i$ : продължителност на интервала на инспекция (дни, обикновено 1 ден)

#### Доклад от изпитването

53. В доклада от изпитването трябва да се съобщава най-малко следната информация:

##### Изпитвано вещество:

- физична природа и, където е подходящо, физични и химични свойства (разтворимост във вода, парно налягане, коефициент на разпределение в почва (или в седимент, ако такава информация е налице), стабилност във вода, и т.н.),
- данни за идентичността на химикала (общоприето наименование, химично наименование, номер по CAS, и т.н.), включително чистота и метод за анализ за количествено определяне на изпитваното вещество.

*Животински вид за изпитването:*

- използвани в изпитването животни: вид, научно наименование, източник на организмите и условия на отглеждане,
- информация за боравенето с агломератите от яйца и ларвите,
- възраст на използваните животни при въвеждането им в съдовете за изпитване.

*Условия на изпитването:*

- използван седимент, т.е., естествен или приготвен седимент,
- за естествения седимент — местоположение и описание на мястото на вземане на пробата, включително, ако е възможно, информация за замърсяването в миналото; характеристики: рН, съдържание на органичен въглерод, съотношение C/N и зърнометричен състав (ако е подходящо),
- подготовка на синтетичния седимент: съставки и характеристики (съдържание на органичен въглерод, рН, влажност, и т.н. в началото на изпитването),
- подготовка на водата за изпитването (ако се използва възстановена вода) и характеристики на водата (концентрация на кислород, рН, проводимост, твърдост, и т.н. в началото на изследването),
- дълбочина на седимента и на водата над седимента,
- обем на водата над седимента и на водата в порите; тегло на влажния седимент съответно със и без водата в порите,
- съдове за изпитване (материал и размери),
- метод за приготвяне на изходни разтвори и на концентрациите за изпитване,
- прилагане на изпитваното вещество: използвани концентрации, брой на повторенията и употреба на разтворител, ако има такава употреба,
- инкубационни условия: температура, редуване на светлина и тъмнина, светлинен интензитет, аериране (периодичност и интензитет),
- подробна информация за храненето, включително вида на храната, приготвянето и режима на хранене.

*Резултати:*

- номинални концентрации на изпитване, измерени концентрации на изпитване, резултати от всички анализи за определяне на концентрацията на изпитваното вещество в съдовете за изпитване,
- качество на водата в съдовете за изпитване, т.е., рН, температура, разтворен кислород, твърдост и амоняк,
- замяна на изпарилата се вода от изпитването, ако има такава,
- брой на достигналите до стадий на имаго мъжки и женски насекоми за съд и за ден,
- брой ларви, недостигнали до стадий на имаго за съд,
- средно индивидуално сухо тегло на ларвите за съд, и ако е подходящо, за стадий,
- процент на достигане до стадий на имаго и концентрация на повторение (общо за мъжките и женските насекоми),
- средна скорост на развитие на достигналите до стадий на имаго насекоми за повторение и за концентрация (общо за мъжките и за женските насекоми),
- предварителни оценки на стойностите на крайни точки за токсичността, напр.  $EC_x$  (с свързаните с тях доверителни интервали), LOEC и/или NOEC, както и статистическите методи, използвани за тяхното определяне,
- обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването, вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

## ПРЕПАТКИ:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*. Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment № 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Глава В.8 от настоящото приложение, Токсичност за земни червеи
- (15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.



- 
- (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48:577-585.
- (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.
-

*Допълнение 1*

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За целите на настоящия метод са използвани следните определения:

**Приготвен седимент** или възстановен, изкуствен или синтетичен седимент е смес от материали, използвани за симулиране на физичните съставки на естествения седимент.

**Вода над седимента** е водата, която се намира над седимента в съда за изпитване.

**Интерстициална**, или вода от порите е водата, която заема пространството между частиците на почвата и седимента.

**Вода с добавка** е вода, към която е добавено изпитваното вещество.

**Изпитван химикал:** Всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

---

## Допълнение 2

**Препоръки за отглеждане на *Chironomus riparius***

1. Ларвите на *Chironomus* може да се отглеждат в кристални панички или в по-големи контейнери. На дъното на контейнера се разпръсква фин кварцов пясък на тънък слой с дебелина 5 до 10 mm. Беше посочено, че кизелгурът (напр. Merck, арт. 8117) също е подходящ субстрат (по-тънък слой от само няколко mm е достатъчен). След това се добавя подходяща вода до достигане на дълбочина от няколко cm. Долива се вода, ако е необходимо, за да се компенсира загубата от изпаряване и за да се предотврати изсушаването. Водата може да се сменя, ако е необходимо. Следва да се осигури умерено проветряване. Съдовете за отглеждане на ларвите следва да се поставят в подходяща клетка, с която да се предотврати отлитането на отгледаните възрастни насекоми. Клетката следва да бъде с достатъчни размери, за да се даде възможност за оформяне на рой от получените възрастни, защото в противен случай може да не се стигне до копулация (най-малко 30 × 30 × 30 cm).
2. Клетките следва да се държат при стайна температура или в помещение с постоянни характеристики на средата при 20 ± 2 °C със светъл период от 16 часа (интензитет около 1 000 lux) и 8 часа тъмнина. Докладвано е, че относителна влажност, по-ниска от 60 %, може да възпрепятства размножаването.

**Вода за разреждане**

3. може да се използва всяка естествена или синтетична вода. Практиката е да се използва вода от кладенец, чешмяна вода и изкуствена среда (напр. среда Elendt „M4“ или „M7“). Преди употреба водата трябва да бъде аерирана. Ако е необходимо, водата за отглеждане може да се обновява, като се внимателно се излива или изсмуква използваната вода от съдовете за отглеждане, без да се унищожават тръбичките на ларвите.

**Хранене на ларвите**

4. Ларвите на *Chironomus* трябва да се хранят с храна за риба на люспи (Tetra Min®, Tetra Phyll® или друга подобна търговска марка храна за риба) по около 250 mg на съд на ден. Храната може да се дава като сух смлян прах или като суспензия във вода: 1,0 g храна във вид на люспи се добавя към 20 ml вода за разреждане и се разбърква, за да образува хомогенна смес. Така полученият препарат може да се дава в количество от около 5 ml на съд дневно (като се разбърква преди употреба). По-старите ларви могат да получават повече храна.
5. Храненето се определя съобразно качеството на водата. Ако средата за отглеждане стане мътна, количеството храна трябва да се намали. Добавянето на храна се следи внимателно. Даването на прекалено малко храна ще предизвика миграция на ларвите в обема на водата, а твърде много храна ще предизвика увеличаване на дейността на микробите и по-ниски нива на кислорода. И двете обстоятелства могат да доведат до по-ниска скорост на развитие.
6. Могат също да се добавят и клетки от някои зелени водорасли (напр. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), когато се подготвят нови съдове за отглеждане.

**Хранене на имагиниралите възрастни**

7. Някои експериментатори изказват идеята, че тампон от памук, напоен с наситен разтвор на захароза може да се използва за хранене на достигналите до стадий на имаго възрастни.

**Имагиниране**

8. При температура от 20 °C ± 2 °C след приблизително 13—15 дни от съдовете за отглеждане на ларви ще започнат да имагинират възрастните насекоми. Мъжките лесно се разпознават по това, че имат перести антени.

**Агломерати от яйца**

9. Щом в съдовете за развъждане се поставят възрастни насекоми, всички съдове за отглеждане трябва да се проверяват три пъти седмично за наличие на пихтиести маси яйца. Ако са налице, масите яйца следва да бъдат внимателно отстранени. Те следва да се преместят в малко блюдо, съдържащо проба от водата за развъждане. Масите яйца се използват за създаване на нов съд за отглеждане (напр. 2—4 маси яйца/съд) или се използват в изпитванията за токсичност.
10. След 2—3 дни следва да се излюпят ларви от първи стадий.

**Създаване на нови съдове за отглеждане**

11. След като е сложено началото на отглеждането, следва да е възможно да се създава нов съд за отглеждане на ларви всяка седмица или по-рядко, в зависимост от изискванията на изпитването, като старите съдове се изваждат от изпитването, след като преобразяването на ларвите в имаго е завършило. Използването на тази система позволява редовно получаване на възрастни насекоми с минимална организация.

**Приготвяне на разтвори за изпитване „М4“ и „М7“**

12. В Elendt (1990) е описана среда „М4“. Среда „М7“ се приготвя като „М4“, освен по отношение на указаните в таблица 1 вещества, при които се използват концентрации, четири пъти по-ниски, отколкото използваните в „М4“. Подготвя се публикация за среда „М7“ (Elendt, лично съобщение). Разтворът за изпитване не трябва да се приготвя според Elendt and Bias (1990), тъй като концентрациите на  $\text{NaSiO}_3$ ,  $5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , посочени за приготвянето на изходния разтвор, не са подходящи.

**Приготвяне на среда „М7“**

13. Всеки изходен разтвор (I) се приготвя отделно и със изходните разтвори (I) се приготвя комбиниран изходен разтвор (II) (вж. таблица 1). За получаване на среда „М7“ 50 ml от комбинирания изходен разтвор (II) и посочените в таблица 2 количества от изходните разтвори на макрохранителни вещества се допълват до 1 литър с дейонизирана вода. Приготвя се изходен разтвор на витамини, като се добавят трите витамина, както е посочено в таблица 3, към дейонизирана вода, и 0,1 ml от комбинирания изходен разтвор на витамини се добавя към крайната среда „М7“ малко преди употреба. (Стандартният разтвор на витамини се съхранява замразен на малки, съразмерни части). Средата се аерира и стабилизира.

Таблица 1

**Изходни разтвори на микроелементи за среди М4 и М7**

Изходни разтвори (I)	Количество (mg), разреждано до 1 l с дейонизирана вода	За приготвянето на комбиниран изходен разтвор (II): смесват се следните количества (ml) от всеки от изходните разтвори (I) и се долива до 1 литър дейонизирана вода		Крайна концентрации в разтворите за изпитване (mg/l)	
		М4	М7	М4	М7
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
$\text{LiCl}$ (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
$\text{RbCl}$ (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
$\text{NaBr}$ (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$\text{ZnCl}_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
$\text{KI}$	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Тези вещества се различават в М4 и М7, както е посочено по-долу.

(2) Разтворите се приготвят отделно, изливат се заедно и незабавно се автоклавира.

Таблица 2

**Изходни разтвори на макрохранителни вещества за среди М4 и М7**

	Количество, разреждано до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Изходни разтвори на макрохранителни вещества, добавяни за приготвяне на среди М4 и М7 (mg/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване М4 и М7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3

	Количество, разреждано до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Изходни разтвори на макро-хранителни вещества, добавяни за приготвяне на среди M4 и M7 (mg/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване M4 и M7 (mg/l)
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	50 000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2 740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	0,1	0,184

Таблица 3

**Изходни разтвори на витамини за среди M4 и M7**

Събират се всички три разтвора на витамини, за да се приготви един общ изходен разтвор на витамини

	Количество, разреждано до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Количество разтвор на витамини, добавяно за приготвяне на среди M4 и M7 (mg/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване M4 и M7 (mg/l)
Тиаминхидрохлорид	750	0,1	0,075
Цианокобаламин (B12)	10	0,1	0,0010
Биотин	7,5	0,1	0,00075

**ПРЕПАТКИ**

BVA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elenkt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elenkt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

## Допълнение 3

## ПРИГОТВЯНЕ НА СИНТЕТИЧЕН СЕДИМЕНТ

**Състав на седимента**

Съставът на синтетичния седимент е, както следва:

Съставка	Характеристики	Процент от сухото тегло на седимента
Торф	Торф от торфен мъх, с рН възможно най-близо до 5,5—6,0 без видими остатъци от растения и фино смлян (размер на частиците $\leq 1$ mm) и изсушен на въздух	4–5
Кварцов пясък	Размер на зърната: > 50 % от частиците следва да бъдат в интервала 50—200 $\mu\text{m}$	75–76
Каолин	Съдържание на каолинит $\geq 30$ %	20
Органичен въглерод	Коригира се чрез добавяне на торф и пясък	2 ( $\pm 0,5$ )
Калциев карбонат	$\text{CaCO}_3$ на прах, химически чист	0,05 - 0,1
Вода	Проводимост $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$	30 - 50

**Приготвяне**

Торфът се изсушава с въздух и се смилва на фин прах. Приготвя се суспензия от желаното количество торф на прах в дейонизирана вода, като се използва високопроизводително хомогенизиращо устройство. Като се използва  $\text{CaCO}_3$ , рН на суспензията се коригира до  $5,5 \pm 0,5$ . Суспензията се аклиматизира най-малко два дни при  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , като се разбърква леко, за да се стабилизира рН и да се създаде стабилна микробна среда. Отново се измерва рН, което трябва да бъде  $6,0 \pm 0,5$ . След това торфената суспензия се смесва с другите съставки (пясък и каолин) и дейонизирана вода, за да се получи хомогенен седимент със съдържание на вода в интервала 30—50 % от сухото тегло на седимента. Измерва се отново рН на крайната смес и, ако е необходимо, се коригира до 6,5—7,5 с  $\text{CaCO}_3$ . Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и съдържанието на органичен въглерод. Освен това, препоръчва се преди използването му в изпитване за токсичност за хириномиди, изкуственият седимент да бъде аклиматизиран в продължение на седем дни при същите условия, при които ще се провежда изпитването.

**Съхранение**

Сухите съставки за приготвянето на изкуствения седимент могат да се съхраняват в сухо и хладно място при стайна температура. Приготвеният (влажен) седимент не трябва да се съхранява преди употребата му в изпитване. Той следва да се употребява незабавно след 7-дневния период за аклиматизация, с който завършва приготвянето му.

**ПРЕПАТКИ:**

Глава В.8 от настоящото приложение, Токсичност за земни червеи.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

## Допълнение 4

## Химични характеристики на приемлива вода за разреждане

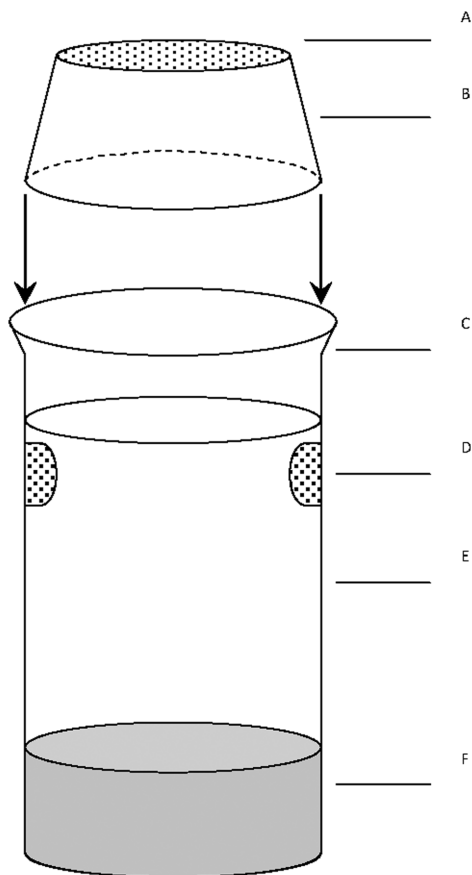
Вещество	Концентрации
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Твърдост, изразена като CaCO <sub>3</sub>	< 400 mg/l (*)
Остатъчен хлор	< 10 µg/l
Общо органофосфорни пестициди	< 50 ng/l
Общо органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили	< 50 ng/l
Общ органичен хлор	< 25 ng/l

(\*) Трябва обаче да се отбележи, че ако се предполага взаимодействие между йоните, от които произтича твърдостта, и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt M4“).

## Допълнение 5

## Насоки за наблюдение на имагинирането на ларвите на хириноmidите

Върху бехеровите чаши, в които се провежда изпитването, се поставят уловители за достигнали до стадия на имаго насекоми. Уловителите са необходими от 20-ия ден на изпитването до края му. Примерно устройство на уловителя е показано по-долу:



A: найлоново платно

B: обърнати пластмасови панички

C: чаша за експозиция без улей

D: екранирани отвори за смяна на водата

E: вода

F: седимент

## V.29. ЛЕСНА БИОРАЗГРАДИМОСТ — CO<sub>2</sub> В ЗАПЕЧАТАНИ СЪДОВЕ (ИЗПИТВАНЕ В СВОБОДНОТО ПРОСТРАНСТВО НАД ТЕЧНОСТТА)

### УВОД

1. Настоящият метод е еквивалентен на Насоките за изпитване (НИ) на ОИСП 310 (2006). Настоящият метод за изпитване е пресяващ метод за оценка на лесната биоразградимост на химикалите, като с него се получава информация, подобна на получаваната с методите, описани в глава В.4 от настоящото приложение А—Е. Поради това, даден химикал, който има добри резултати при настоящия метод за изпитване, може да се смята за лесно биоразградим и следователно бързо разградим в околната среда.
2. Добре разработеният метод с използване на въглероден диоксид, основан на оригиналното изпитване на Sturm (2) за оценка на биоразградимостта на органични химикали чрез измерване на въглеродния диоксид, получен в резултат от дейността на микробите, обикновено се предпочита за изпитване на малко разтворими и силно адсорбируеми химикали Той се избира и за разтворими (но не летливи) химикали, тъй като много изследователи смятат, че излъчването на въглероден диоксид е единственото еднозначно доказателство на микробна активност. Елиминирането на разтворения органичен въглерод може да се осъществи чрез физични и химични процеси — адсорбция, изпаряване, утаяване, хидролиза, както и в резултат на микробна активност и много небиологични реакции, които поглъщат кислород; абиотичното получаване на въглероден диоксид от органични химикали се среща рядко. в оригиналното и в модифицираното изпитване на Sturm (1)(2) CO<sub>2</sub> се отделя от течната фаза в абсорбиращи съдове чрез барботиране (т.е., пропускане на мехурчета въздух през течната фаза за отделяне на CO<sub>2</sub>), а във версията на Larson (3)(4) CO<sub>2</sub> се пренася от реакционния съд към абсорбери с помощта на въздух,



- несъдържащ  $\text{CO}_2$ , който преминава през пространството над течната фаза, като освен това изпитвателният съд непрекъснато се разклаща. Реакционният съд се разклаща само в модификацията на Larson; в ISO 9439 (5) и в оригиналната версия от САЩ (6) разбъркване се посочва само за неразтворими вещества, като и двата източника предписват по-скоро барботиране, отколкото замяна на газовата фаза от пространството над течната. В друг официален метод (7) на Агенцията на САЩ за защита на околната среда (US EPA), разработен въз основа на метода на Gledhill (8), разклащаният реакционен съд е изолиран от атмосферата, и произведеният  $\text{CO}_2$  се събира във вътрешен алкален уловител директно от газовата фаза, както в класически респирометър на Warburg/Barcroft.
- Доказано е обаче, че неорганичният въглерод (IC) се натрупва в средата при провеждане на стандартно или модифицирано изпитване на Sturm (9) върху редица химикали. При разграждане на 20 mg C/l анилин са установени концентрации на IC, достигали до 8 mg/l. Поради това, събирането на  $\text{CO}_2$  в алкалните уловители не отразява вярно количеството  $\text{CO}_2$ , произвеждано от микроорганизмите в различни междинни моменти по време на разграждането. В резултат на това изискването, според което > 60 % от теоретично максималната продукция на  $\text{CO}_2$  ( $\text{ThCO}_2$ ) трябва да бъде получена в рамките на „10-дневен период“ (десетте дни непосредствено след достигането на биоразграждане от 10 %), за да може изпитваният химикал да бъде класифициран като лесно биоразградим, няма да може да бъде удовлетворено за някои химикали, които биха били класифицирани като такива, ако се използва методът, основан на елиминирането на разтворения органичен въглерод (DOC).
  - Когато процентът на разграждане е с по-ниска от очакваната стойност, вероятно е IC да се натрупва в изпитвания разтвор. В такъв случай разградимостта може да се оценява с помощта на други изпитвания за лесна биоразградимост.
  - Други недостатъци на метода на Sturm (обременителен, изискващ много време, по-податлив на лабораторни грешки и неприложим за летливи химикали) дадоха тласък на търсене на техника с херметично затворен съд, различна от тази на Gledhill, а не такава с преминаващ газ (10)(11). Boatman et al (12) преразгледаха по-ранните методи и възприеха затворена система със свободно пространство, в която  $\text{CO}_2$  се освобождава в свободното пространство след инкубация с помощта на ацидификация на средата.  $\text{CO}_2$  се измерваше с газово-хроматографски (ГХ) анализ (газова хроматография/ионна хроматография, GC/IC) на автоматично вземани проби от свободното пространство, но не се вземаше предвид разтвореният неорганичен въглерод (DIC) в течната фаза. Освен това, използваните съдове бяха твърде малки (20 ml) и съдържаха само 10 ml среда, което предизвикваше проблеми, напр. при добавянето на по-необходимо много малки количества неразтворими изпитвани химикали, и/или поради възможността в инокулираната среда да няма достатъчно (или изобщо) микроорганизми, способни да разграждат изпитвания химикал.
  - Посочените трудности бяха преодоляни с независимите изследвания на Struijs и Stoltenkamp (13) и на Birch и Fletcher (14), като последните се ръководеха от опита си от работата с апарат, използван при изпитването за анаеробно биоразграждане (15). При първия метод (13)  $\text{CO}_2$  се измерва в свободното пространство след ацидификация и уравнивяване, докато при втория (14) разтвореният неорганичен въглерод се измерва в течната и в газообразната фаза, но без обработка; над 90 % от получения IC се намира в течната фаза. И двата метода имат предимства по отношение на метода на Sturm, състоящи се в това, че системата е по-компактна и с нея се работи по-лесно, летливите химикали могат да се изпитват и се избягва опасността от забавяне на измерването на произведения  $\text{CO}_2$ .
  - Двата подхода са обединени в стандарта на ISO (изпитване на  $\text{CO}_2$  в свободно пространство) (16), който е бил предмет на кръгово изпитване (17) и който е основата на настоящия метод за изпитване. В метода за изпитване на US EPA също така са били използвани и двата подхода (18). Бяха препоръчани два метода за измерване на  $\text{CO}_2$ , а именно измерване на  $\text{CO}_2$  в свободното пространство над течността след ацидификация (13) и измерване на IC в течната фаза след добавянето на излишък на основа. Последният беше въведен от Peterson в извършването от CONCAWE (19) кръгово изпитване на метода за изпитване в свободното пространство над течността, изменен с оглед на измерването на присъщата биоразградимост. Измененията, въведени от преразгледаната версия от 1992 г. (20) на методите от глава В.4 на настоящото приложение по отношение на лесната биоразградимост, бяха включени в настоящия метод за изпитване, така че условията (среда, продължителност и т.н.) са същите като онези в модифицираното изпитване на Sturm (20). Birch и Fletcher (14) показаха, че по отношение на едни и същи химикали изпитването в свободното пространство над течността дава много сходни резултати с извършеното от ОИСР кръгово изпитване (21) на преразгледаните методи за изпитване.

#### ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

- В буферна среда с минерални соли, инокулирана със смесена популация микроорганизми, се инкубира изпитваният химикал, обикновено при 20 mg C/l, като единствен източник на въглерод и енергия. Изпитването се извършва в херметично затворени стъкла с оставено свободно пространство над течността, което служи за резервоар на кислород за аеробно биоразграждане. Отделянето на  $\text{CO}_2$ , получен в резултат на окончателното аеробно биоразграждане на изпитвания химикал, се определя чрез измерване на IC, отделен в стъклата за изпитване над количеството на IC, получен в контролните стъкла, които съдържат само инокулирана среда. Степента на биоразграждане се изразява като процент от теоретично максималната продукция на IC ( $\text{ThIC}$ ), въз основа на количеството на добавения в началото изпитван химикал (изразен като органичен въглерод).
- Мога да се измерят също и елиминирането на DOC и/или степента на първично биоразграждане на изпитвания химикал (20).

## ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

10. Трябва да се установи — от химичната структура или от измерване — съдържанието на органичен въглерод (% w/w) на изпитвания химикал, така че да може да се изчисли процентът на разграждане. За летливите изпитвани химикали, измерената или изчислената стойност на константата от закона на Хенри може да бъде полезна при определянето на съотношението между обемите на течността и свободното пространство. За избора на подходяща концентрация на изпитване и за тълкуването на резултати, показващи слаба биоразградимост, е полезно да се разполага с информация за токсичността на изпитвания химикал за микроорганизмите: препоръчва се да се включи контролен съд за отчитане на инхибирането, освен ако не е известно, че изпитваният химикал не инхибира дейността на микроорганизмите.

## ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДА

11. Изпитването е приложимо към разтворими и към неразтворими във вода изпитвани химикали, но следва да се осигури добро диспергиране на изпитвания химикал. Като се използва препоръчаното обемно съотношение от 1:2 между свободно пространство и течност, могат да се изпитват и летливи химикали с константа от закона на Хенри до  $50 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ , тъй като частта на изпитвания химикал в свободното пространство няма да надхвърли 1 % (13). Може да се използва и свободно пространство с по-малък обем, когато се изпитват химикали с по-голяма летливост, но тяхната бионаличност може да се окаже ограничаващ фактор, особено ако са малко разтворими във вода. Трябва обаче да се следи обемното съотношение между свободното пространство и течността и концентрацията на изпитвания химикал да бъдат такива, че да е налице достатъчно кислород, който да даде възможност за осъществяване на пълно аеробно биоразграждане (т.е., да се избягва използването на висока концентрация на субстрата и малко свободно пространство). Насоки по тези въпроси може да се намерят в (13)(23).

## РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

12. За да се провери процедурата на изпитване, следва успоредно да се изпита и референтен химикал, чиято биоразградимост е известна. За тази цел при изпитването на разтворими във вода химикали могат да се използват анилин, натриев бензоат или етиленгликол, а за малко разтворимите изпитвани химикали — 1-октанол (13). Биоразграждането на посочените химикали трябва да достигне > 60 % от ThIC в рамките на 14 дни.

## ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

13. В кръговото изпитване на метода, извършено от ISO (17), бяха получени следните резултати при използване на препоръчаните условия, в това число 20 mg C изпитван химикал/l.

Изпитван химикал	Среден процент на биоразграждане (28 дни)	Коефициент на вариация (%)	Брой на лабораториите
Анилин	90	16	17
1-октанол	85	12	14

Варирането в рамките на изпитването (повторяемост), когато се използва анилин, е ниско, с коефициенти на вариране, не по-големи от 5 % в почти всички опити. В двата случая, когато повторяемостта е била по-лоша, по-голямото вариране вероятно е било причинено от висока продукция на IC в празните проби. Повторяемостта е била по-лоша с 1-октанол, но въпреки това е била по-ниска от 10 % в 79 % от опитите. Това по-голямо вариране в рамките на изпитването може да е било причинено от грешки в дозирането, поради малкия обем (3 до 4 µl) 1-октанол, който е трябвало да бъде инжектиран в запечатаните изпитвателни стъкла. Ако се използват по-ниски концентрации на изпитваните химикали, биха се получили по-високи коефициенти на вариация, особено при концентрации, по-ниски от 10 mg C/l. Този проблем би могъл да се преодолее частично с намаляване на концентрацията на общия неорганичен въглерод (TIC) в инокулума.

14. В извършено от ЕС (24) кръгово изпитване на пет повърхностноактивни вещества, добавени в концентрация от 10 mg C/l, бяха получени следните резултати:

Изпитван химикал	Среден процент на биоразграждане (28 дни)	Коефициент на вариация (%)	Брой на лабораториите
Тетрапропилен Бензенсулфонат	17	45	10
Диизооктилсулфо сукцинат (анионен)	72	22	9
Хексадецилтриметил (*) Амониев хлорид (катионен)	75	13	10

Изпитван химикал	Среден процент на биоразграждане (28 дни)	Коефициент на вариация (%)	Брой на лабораториите
Изононилфенол (етоксилат) <sub>9</sub> (нейонен)	41	32	10
Кокоамидпропил диметилхидрокси сулфобетаин (амфотерен)	60	23	11

(\*) Беше добавен SiO<sub>2</sub> за неутрализиране на токсичността.

Резултатите показват, че по принцип, варирането е по-високо за по-малко разградимите повърхностноактивни вещества. Варирането в рамките на изпитването е било по-ниско от 15 % за над 90 % от случаите, а най-високата му стойност е достигала 30—40 %.

**ЗАБЕЛЕЖКА:** Повечето повърхностноактивни вещества не са съставени от молекули от само един вид, а са смеси от изомери, хомолози и т.н., които се разграждат след различни характерни латентни периоди и с различна скорост, което води до неясни, необезопасителни криви, така че прагът от 60 % може да не бъде достигнат в рамките на „10-дневния период“, дори ако молекулите от всеки отделен вид биха достигнали 60 %, ако бъдат изпитани поотделно. Това може да се наблюдава и с други сложни смеси.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Апаратура

15. Стандартна лабораторна апаратура, както и:

- а) стъкла за серум, запечатани със запушалки от бутилов каучук и алуминиеви капачки. Препоръчаният размер е 125 ml, с обща вместимост около 160 ml (в този случай обемът на всяко стъкло трябва да бъде  $160 \pm 1$  ml). Може да се използва стъкло с по-малък размер, ако резултатите удовлетворяват условията, описани в точки 66 и 67;
- б) анализатор за въглерод или друг инструмент (напр. газов хроматограф) за измерване на неорганичния въглерод;
- в) високоточни спринцовки за пробите от газове и течности;
- г) орбитална клатачна машина в среда с контролирана температура;
- д) източник на въздух без CO<sub>2</sub> — такъв въздух може да се приготви чрез пропускане на въздух през гранули натронкалк, или се използва газова смес от 80 % N<sub>2</sub>/20 % O<sub>2</sub> (по избор) (вж. точка 28);
- е) уред за мембранно филтруване с пори с размер 0,20—0,45 μm (по избор);
- ж) анализатор на органичен въглерод (по избор).

##### Реагенти

16. Използват се само чисти за анализ реагенти.

##### Вода

17. Използва се дестилирана или дейонизирана вода, която съдържа  $\leq 1$  mg/l общ органичен въглерод. Това представлява  $\leq 5$  % от началното съдържание на органичен въглерод, въведен с предписаната доза от изпитвания химикал.

##### Изходни разтвори за средата от минерални соли

18. Изходните разтвори и средата от минерални соли са сходни с използваните в ISO 14593 (16) и в изпитванията за „лесна биоразградимост“ В.4 (20). Употребата на по-високи концентрации амониев хлорид (2,0 g/l вместо 0,5 g/l) би била необходима само в изключителни случаи, напр. когато концентрацията на изпитвания химикал е  $> 40$  mg C/l. Изходните разтвори следва да се съхраняват на студено и да се унищожават след шест месеца или по-рано, ако се забележи утаяване или размножаване на микроби. Приготвят се следните изходни разтвори:

а) Калиев дихидрогенфосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 8,50 g

Дикалиев хидрогенфосфат, ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 21,75 g

Динатриев хидрогенфосфат дихидрат ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 33,40 g

Амониев хлорид, ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,50 g

Съставките се разтварят във вода и се долива вода до 1 литър. Стойността на рН на разтвора следва да бъде 7,4 ( $\pm 0,2$ ). Ако това условие не е изпълнено, се приготвя нов разтвор.

б) Калциев хлорид дихидрат ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 36,40 g

Разтваря се във вода и се долива вода до 1 литър.

в) Магнезиев сулфат хептахидрат ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 22,50 g

Разтваря се във вода и се долива вода до 1 литър.

г) Железен(III) хлорид хексахидрат ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,25 g

Съставките се разтварят във вода, долива се вода до 1 литър и се добавя една капка концентрирана  $\text{HCl}$ .

*Приготвяне на минерална среда*

9. Смесват се 10 ml от разтвор а) с приблизително 800 ml вода (точка 17), прибавя се по 1 ml от разтвори от б) до г) и се долива вода до 1 l (точка 17).

*Други реагенти*

20. Концентрирана ортофосфорна киселина ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (> 85 % маса на обем).

*Разтвор на натриев хидроксид 7M*

21. 280 g натриев хидроксид ( $\text{NaOH}$ ) се разтварят в 1 литър вода (точка 17). Определя се концентрацията на разтворения неорганичен въглерод на получения разтвор и тази стойност се взема предвид при изчисляването на резултатите от изпитването (вж. точки 55 и 61), по-специално по отношение на критерия за валидност, посочен в точка 66, б). Ако концентрацията на разтворения неорганичен въглерод е прекалено висока, приготвя се нов разтвор.

*Изпитвано вещество*

22. От достатъчно разтворим във вода изпитван химикал се приготвя изходен разтвор във вода (точка 17) или в средата за изпитване (точка 19) при концентрация 100 пъти по-висока от крайната концентрация, която ще се използва в изпитването; може да се наложи да се коригира рН на изходния разтвор. Стандартният разтвор трябва се добави към минералната среда, за да се получи крайна концентрация на органичен въглерод между 2 и 40 mg C/l, за предпочитане 20 mg C/l. Ако се използват концентрации по-ниски от посочените, получената точност може да бъде по-ниска. Разтворимите и неразтворимите течни химикали могат да се добавят в съдовете директно, като се използват високоточни спринцовки. Малко разтворимите и неразтворимите изпитвани химикали могат да наложат специално третиране (25). Възможностите са следните:

а) директно добавяне на количества с известно тегло;

б) диспергиране с ултразвук преди добавянето;

в) диспергиране с помощта на емулгатори, по отношение на които преди добавянето следва да се установи дали имат инхибиращо или стимулиращо въздействие върху активността на микроорганизмите;

г) адсорбция на течните изпитвани химикали или разтваряне в подходящ летлив разтворител, върху инертна среда или подложка (напр. филтър от стъклена вата), последвани от изпаряване на разтворителя, ако е използван такъв, и директно добавяне на известните количества;

д) добавяне на известен обем от разтвор на изпитвания химикал в лесно изпаряващ се разтворител в празен съд за изпитване, последвано от изпаряване на разтворителя.

Трябва да се извърши изпитване дали агентите или разтворителите, използвани във в), г) и д), имат стимулиращо или инхибиращо въздействие върху микроорганизмите (вж. точка 42, б).

#### *Референтен химикал*

23. Приготвя се изходен разтвор от (разтворим) референтен химикал във вода (точка 17) при концентрация за предпочитане 100 пъти по-висока от крайната концентрация (20 mg C/l), която ще се използва в изпитването.

#### *Проверка за инхибиращи свойства*

24. Често пъти изпитваните химикали не се разграждат в достатъчна степен при условията, използвани при оценката на лесната биоразградимост. Една от възможните причини е, че изпитваният химикал има инхибиращо въздействие върху инокулума при концентрацията, при която се прилага в изпитването. При планирането на изпитването може да се предвиди проверка за инхибиращи свойства с оглед да се улесни идентификацията (със задна дата) на инхибирането като възможна причина или способстващ фактор. Напротив, проверката за инхибиращи свойства може да опровергае подобни интерференции и да покаже, че слабото или липсващо разграждане се дължи единствено на неспособността на микроорганизмите да атакуват веществото при условията на изпитването. За да се получи информация за токсичността на изпитвания химикал за (аеробните) микроорганизми, трябва да се приготви разтвор в средата за изпитване, който съдържа изпитвания химикал и референтния химикал (точка 19), всеки в концентрацията, в която са били добавени в средата за изпитване при изпитването (вж. точки 22 и 23).

#### *Инокулум*

25. Инокулумът може да произхожда от различни източници: активна утайка; изхопящи отпадъчни води (нехлорирани); повърхностни води и почви; смес от всичко посочено (20). Биоразграждащата активност на източника следва да се провери, като се използва референтен химикал. Независимо от източника, не трябва да се използват микроорганизми, които вече са били изложени на изпитвания химикал, ако процедурата се използва като изпитване за лесна биоразградимост.

**Предупреждение:** Активната утайка, изхопящите отпадъчни води и отпадъчните води съдържат патогенни организми и с тях трябва да се работи внимателно.

26. Въз основа на опита, оптималният обем на инокулума е този, който:

- е достатъчен да предизвика адекватно биоразграждане,
- разгражда референтния химикал до предвидения процент (вж. точка 66),
- осигурява  $10^2$  до  $10^5$  създаващи колонии единици на милилитър в крайната смес,
- обикновено дава концентрация от 4 mg/l суспендирани твърди частици в крайната смес, когато се използва активна утайка; могат да се използват и концентрации от 30 mg/l, но е възможно те да увеличат значително получаването на  $\text{CO}_2$  в контролните съдове (26),
- осигурява по-малко от 10 % от началната концентрация на органичния въглерод, внесен с изпитвания химикал,
- е обикновено 1—10 ml инокулум за 1 литър разтвор за изпитване.

#### *Активна утайка*

27. Взема се свежа активна утайка от резервоара за аериране на пречиствателна станция за отпадъчни води или от лабораторен модул, които преработват предимно битови отпадъчни води. Ако е необходимо, едрите частици следва да се отделят чрез пресяване (напр., като се използва сито с размер на отворите  $1 \text{ mm}^2$ ), а утайката трябва да се поддържа при аеробни условия, докато се употреби.
28. Друга възможност е след премахване на по-грубите частици утайката да се остави да се утаи или да се центрофугира (например при 1 100 g в продължение на 10 min). Отстранява се бистрият разтвор. Калта може да се промива с минерална среда. Концентрираната утайка се разрежда с минерална среда до концентрация 3—5 g суспендирани вещества на литър и след това се аерира, колкото се изисква.
29. Калта трябва да се вземе от обикновена добре работеща пречиствателна станция. Ако утайката трябва да бъде взета от силно натоварена пречиствателна станция, или има съмнение, че съдържа инхибитори, тя трябва да се промие. Ресуспендираната утайка се утаява или центрофугира след старателно разбъркване, отлива се суперна-тантът и промитата с нова минерална среда утайка отново се ресуспендира. Тази процедура се повтаря, докато се прецени, че утайката е чиста от странични вещества или инхибитор.
30. След достигане на пълно суспендиране или при необработена утайка, преди употреба се отделя проба за определяне на сухото тегло на суспендираните частици.

31. Друга възможност е да се хомогенизира активната утайка (3—5 g суспендирани частици/l). Калта се обработва в механичен хомогенизатор в продължение на 2 min при средна скорост. Хомогенизираната утайка се утаява за 30 min или по-дълго, ако е необходимо, и течността се отлива и се използва като инокулум в концентрация от около 10 mg/l в минерална среда.
32. Възможно е да се намали още повече отделянето на CO<sub>2</sub> в контролните съдове без изпитван химикал чрез аериране на утайката в продължение на една нощ, като се използва несъдържащ CO<sub>2</sub> въздух. Изполваната концентрация на инокулума в това изпитване трябва да възлиза на 4 mg/l твърди частици от активната утайка.

#### *Вторични изходящи отпадъчни води*

33. Друга възможност е инокулумът да се вземе от вторични изходящи води на пречиствателна станция или от лабораторен модул, получаващи предимно битови отпадъчни води. Пробата се съхранява при аеробни условия и се използва в деня, в който е взета, или ако е необходимо, се аклиматизира. Изходящите води се филтрат през груб филтър, за да се отделят едрите частици, измерва се рН.
34. За да се намали съдържанието на IC, филтратът се барботира един час с въздух, несъдържащ CO<sub>2</sub> (точка 15, д) и се поддържа рН от 6,5 с помощта на ортофосфорна киселина (точка 20). Стойността на рН се връща към изходната с натриев хидроксид (точка 21) и след утаяване за около 1 час, подходящо количество от супернатанта се отделя за целите на инокулацията. Барботирането намалява съдържанието на IC на инокулума. Например, когато за инокулум се използва препоръчаният максимален обем филтрани барботирани изходящи води (100 ml) на литър, количеството IC в контролните съдове без изпитван химикал е в интервала 0,4—1,3 mg/l (14), което представлява 2—6,5 % от въглерода на изпитвания химикал при 20 mg C/l и 4—13 % при 10 mg C/l.

#### *Повърхностни води*

35. Взема се проба от подходящи повърхностни води. Тя се съхранява при аеробни условия и се използва в деня, в който е взета. Пробата се концентрира, ако е необходимо, с помощта на филтруване или центрофугиране. Обемът на инокулума, който трябва да се използва във всеки съд за изпитване, трябва да отговаря на критериите, посочени в точка 26.

#### *Почви*

36. Взема се проба от подходяща почва на дълбочина до 20 cm под повърхността на почвата. Отстраняват се камъните, остатъците от растения и безгръбначните от пробата, след което тя се пресява през сито с размер на отворите от 2 mm (ако пробата е твърде влажна, за да бъде незабавно пресята, тя трябва частично да се изсуши с въздух, за да се улесни пресяването). Тя се съхранява при аеробни условия и се използва в деня, в който е взета (ако пробата се пренася в хлабаво затворен полиетиленов чувал, тя може да се съхранява при 2—4 °C в същия чувал до 1 месец).

#### *Предварителна подготовка на инокулум*

37. Инокулумът може да се адаптира предварително към условията на експеримента, но не и към изпитвания химикал. Предварителното адаптиране може да намали отделянето на CO<sub>2</sub> в съдовете без химикал. Предварителната подготовка се изразява в аериране на активната утайка след разреждане с изпитвателна среда до достигане на стойност от 30 mg/l, като се използва влажен въздух, несъдържащ CO<sub>2</sub> в оттока в продължение на най-много 5—7 дни при температурата на изпитването.

#### ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

##### *Брой стъкла:*

38. Броят на стъклата (точка 15, а), необходими за изпитването, зависи от честотата на анализа и продължителността на изпитването.
39. Препоръчва се да се анализират по три екземпляра стъкла след достатъчен брой времеви интервали, така че да е възможно да се идентифицира 10-дневният период. Също така, анализират се най-малко пет изпитвателни стъкла (точка 15, а) от сериите (а), (б) и (в), (вж. точка 42) в края на изпитването, за да се изчислят доверителни интервали от 95 % за средния процент на биоразграждане.

##### *Среда с инокулум*

40. Инокулумът се използва в концентрация от 4 mg/l сухо твърдо вещество от активна утайка. Непосредствено преди употреба се приготвя достатъчно количество среда с инокулум, като се прибавя например 2 ml подходящо третирана активна утайка (точки 27—32) при концентрация 2 000 ml/l в един литър среда от минерални соли (точка 19). Когато се използват вторични изходящи отпадъчни води, добавят се 100 ml изходящи води (точка 33) към 900 ml среда от минерални соли (точка 19) и се долива вода до 1 литър.

*Подготовка на стъклата*

41. Аликвоти от инокулираната среда се наливат в стъкла с повторения, така че да се постигне съотношение между свободното пространство и течността, равно на 1:2 (напр. в съд с вместимост 160 ml се наливат 107 ml). Може да се използват и други стойности на съотношението, но трябва да се има предвид предупреждението от точка 11. Какъвто и да е видът на използвания инокулум, трябва да се внимава инокулираната среда да е добре размесена, така че да бъде равномерно разпределена по изпитвателните стъкла.
42. Приготвят се набори от стъкла (точка 15, а), които съдържат следното:
  - а) съдове за изпитване (означени като  $F_T$ ), съдържащи изпитвания химикал;
  - б) контролни съдове без химикал (означени като  $F_B$ ), съдържащи само среда за изпитване и инокулум; добавят се химикали, разтворители, агенти или филтри от стъклена вата, използвани за въвеждане на изпитвания химикал в съдовете за изпитване;
  - в) съдове (означени като  $F_C$ ) за проверка на процедурата, съдържащи референтния химикал;
  - г) ако е необходимо, съдове (означени като  $F_I$ ) за проверка на възможно инхибиращо въздействие на изпитвания химикал, съдържащи изпитвания химикал и референтен химикал със същите концентрации (точка 24) като съответно в съдовете  $F_T$  и  $F_C$ ;
  - д) съдове (означени като  $F_S$ ) за проверка на възможно абиотично разграждане, съдържащи същото както в а) плюс 50 mg/l  $HgCl_2$  или стерилизирани по друг начин (напр. чрез автоклавиране).
43. Разтворимите във вода изпитвани химикали и референтните химикали се добавят като водни изходни разтвори (точки 22, 23 и 24), за да се постигне концентрация от 10 до 20 mg C/l.
44. Неразтворимите изпитвани химикали и неразтворимите референтни химикали се добавят в стъклата по различни начини (вж. точка 22 а)—д) в зависимост от естеството на изпитвания химикал преди или след добавянето на инокулираната среда, според метода за третиране на изпитвания химикал. Ако се използва една от процедурите, посочени в точка 22, а)—д), контролните стъкла без химикал  $F_B$  (точка 42, б) се третират по сходен начин, но без да се добавя изпитваният химикал или референтният химикал.
45. Летливите изпитвани химикали следва да се инжектират в запечатаните стъкла (точка 47), като се използва микроспринцовка. Дозата се изчислява, като се вземат инжектираният обем и плътността на изпитвания химикал.
46. Когато е необходимо, в съдовете се добавя вода, за да може във всеки съд да има еднакво количество течност. Трябва да се гарантира, че съотношението между свободното пространство и течността (обикновено 1:2) и концентрацията на изпитвания химикал са такива, че в свободното пространство има достатъчно кислород за осъществяване на пълно биоразграждане.
47. Всички стъкла след това се запечатват херметично, напр. със запушалки от бутилов каучук и алуминиеви капачки. Летливите изпитвани химикали се добавят именно на този етап (точка 45). Ако трябва да се следи намаляването на концентрацията на DOC на изпитвателния разтвор и да се измери в момент нула началната концентрация на IC (стерилни контролни съдове, точка 42, д), от съда за изпитване се взема съответната проба. След това съдът и съдържанието му се отстраняват.
48. Запечатаните стъкла се поставят на въртяща се клатачна машина (точка 15, г), със скорост на клатене, която е достатъчна да поддържа съдържанието на стъклата добре смесено и в суспензия (напр. 150—200 об/мин), и се инкубират на тъмно при температура  $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ .

*Вземане на проби*

49. Схемата на вземане на проби зависи от латентния период и скоростта на биоразграждане на изпитвания химикал. В деня на вземане на проби се изваждат стъкла за анализ, като това се извършва най-малко веднъж седмично или по-често (напр. два пъти седмично), ако се цели съставяне на пълна крива на биоразграждане. Изискваният брой стъкла с повторения от групите  $F_T$ ,  $F_B$  и  $F_C$  и, ако са използвани,  $F_I$  и  $F_S$ , се взема от клатачната машина (вж. точка 42). Изпитването обикновено трае 28 дни. Ако кривата на биоразграждане показва, че е достигната фаза на плато преди 28-ия ден, изпитването може да се прекрати по-рано от 28-ия ден. Вземат се проби за анализ от пет стъкла, предвидени за 28-ия ден на изпитването, и се използват резултатите за изчисляване на доверителните граници или на коефициента на вариация на процента на биоразграждане. От стъклата, които са предназначени за проверка на инхибиращото въздействие и абиотичното разграждане, не е необходимо толкова често пробовземане, колкото от останалите; би било достатъчно да се вземат проби от първия и от 28-я ден.

*Анализ на неорганичния въглерод (IC)*

50. Отделянето на  $\text{CO}_2$  в стъклата се определя чрез измерване на концентрацията на неорганичен въглерод (IC) по време на инкубацията. Съществуват два препоръчани метода, описани по-долу, за измерване на количеството на IC, получен при изпитването. Тъй като методите могат да дадат леко различаващи се резултати, само един от тях може да се използва в изпитването.
51. Метод (а) се препоръчва, ако е вероятно средата да съдържа остатъци напр. от филтър от стъклени нишки и/или неразтворим изпитван химикал. Този анализ може да се извърши с използване на газов хроматограф, ако не е наличен анализатор на въглерод. Важно е когато се анализира газът от свободното пространство, стъклата да бъдат с температурата, която са имали при изпитването, или близка до нея. Метод (б) може да е по-лесен за прилагане в лаборатории, използващи анализатори на въглерод за измерване на IC. Важно е разтворът на натриев хидроксид (точка 21), който се използва за преобразуване на  $\text{CO}_2$  в карбонат, да бъде пряно приготвен, или съдържанието на IC в него да бъде известно, така че то да се вземе предвид при изчисляване на резултатите от изпитването (вж. точка 66, б).

*Метод (а): Ацидификация до  $\text{pH} < 3$* 

52. Преди всяка група анализи, анализаторът на IC се калибрира с подходящ стандарт за IC (напр. 1 % т/т  $\text{CO}_2$  в  $\text{N}_2$ ). През запушалката във всяко стъкло се инжектира концентрирана ортофосфорна киселина (вж. точка 20), за да се намали  $\text{pH}$  на средата до  $< 3$  (напр. добавя се 1 ml на 107 ml изпитвателна среда). Стъклата се поставят отново на клатачната машина. След разклащане в продължение на един час при температурата на изпитването стъклата се свалят от клатачната машина, от свободното пространство се изтеглят аликвоти газ (напр. 1 ml) и се инжектират в анализатора на IC. Измерените концентрации на IC се записват като  $\text{mg C/l}$ .
53. Методът се основава на принципа, че след ацидификация до  $\text{pH} < 3$  и уравнивяване при 20 °C, равновесната константа на разпределението на  $\text{CO}_2$  между течната и газообразната фаза в изпитвателните стъкла става равна на 1,0, когато се измерва като концентрация (13). Тази зависимост следва да се докаже поне веднъж за изпитвателната система както следва:

Приготвят се стъкла, съдържащи 5 и 10  $\text{mg/l}$  IC, като се използва разтвор от безводен натриев карбонат ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) в несъдържаща  $\text{CO}_2$  вода, приготвена чрез ацидификация на вода до  $\text{pH}$  6,5 с концентрирана ортофосфорна киселина (точка 20), барботирана една нощ с несъдържащ  $\text{CO}_2$  въздух и повишаване на  $\text{pH}$  до неутрална реакция с основа. Трябва да се гарантира, че съотношението между свободното пространство и течността е същото като в изпитванията (напр. 1:2). Извършва се ацидификация и уравнивяване, както е описано в точка 52, и се измерват концентрациите на IC в свободното пространство и в течната фаза. Проверява се дали двете концентрации са еднакви в пределите на експерименталната грешка. Ако не са, анализаторът следва да преразгледа процедурите на изпитването. Не е необходимо проверката на разпределението на IC между течната и газовата фаза да се извършва при всяко изпълняване на изпитването; тя може да се направи при калибрирането.

54. Ако трябва да се измерва елиминирането на DOC (само при разтворими във вода изпитвани химикали), следва да се вземат проби от течната фаза от отделни стъкла (в които не е извършвана ацидификация), които се филтрират през мембранен филтър и инжектират в анализатор на DOC. Същите стъкла могат да се използват и за други анализи, както е необходимо, за анализиране на първичното биоразграждане.

*Метод (б): превръщане на  $\text{CO}_2$  в карбонат*

55. Преди всяка група анализи, анализаторът на IC се калибрира с подходящ стандарт за IC – например разтвор на натриев бикарбонат ( $\text{NaHCO}_3$ ) във вода, несъдържаща  $\text{CO}_2$  (вж. точка 53), в обхвата 0—20  $\text{mg IC/l}$ . През запушалката във всяко стъкло се инжектира разтвор на натриев хидроксид (7M, точка 21) (напр. 1 ml на 107 ml среда) и стъклата се разклащат в продължение на 1 час при температурата на изпитването. Трябва да се използва един и същи разтвор на NaOH във всички стъкла, които се изваждат от изпитването в един ден, но непременно във всички пробовземания в процеса на изпитването. Ако се изискват абсолютните стойности на IC за контролните стъкла без изпитвания химикал при всички проби в изпитването, определянето на IC в разтвора на NaOH трябва да се прави всеки път, когато той се използва. Стъклата се свалят от клатачната машина и се изчаква утаяването. Със спринцовка от всеки съд се изтеглят подходящи количества (напр. 50—1 000  $\mu\text{l}$ ) от течната фаза. Пробите се инжектират в анализатора на IC и се записват концентрациите на IC. Трябва да се гарантира, че използваният анализатор е оборудван за работа с основните проби, използвани в метода.
56. Методът се основава на принципа, че след добавянето на основа и разклащане, концентрацията на IC в свободното пространство е пренебрежимо малка. Това трябва да се провери за изпитвателната система поне веднъж, като се използват стандарти на IC, добави се основа и се извърши уравнивяване, измери се концентрацията на IC в свободното пространство и в течната фаза (вж. точка 53). Концентрацията в свободното пространство трябва да клони към нула. Не е необходимо при всяко изпълняване на изпитването да се извършва проверка на почти пълната абсорбция на  $\text{CO}_2$ .
57. Ако трябва да се измерва елиминирането на DOC (само при разтворими във вода изпитвани химикали), следва да се вземат проби от течната фаза от отделни стъкла (в които не е добавяна основа), които се филтрират през мембранен филтър и се инжектират в анализатор на DOC. Същите стъкла могат да се използват и за други анализи, както е необходимо, за анализиране на първичната биоразградимост.



## ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

**Изчисляване на резултатите**

58. Ако се предположи, че изпитваният химикал е минерализиран 100 % до CO<sub>2</sub>, ThIC, който е в повече спрямо получения в контролните съдове без добавен изпитван химикал, е равен на общия органичен въглерод (ТОС), добавен във всяко стъкло в началото на изпитването, т.е.:

$$\text{ThIC} = \text{ТОС.}$$

Масата (mg) на общия неорганичен въглерод (ПИС) във всяко стъкло е:

$$\text{ПИС} = (\text{mg C в течността} + \text{mg C в свободното пространство}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Уравнение [1]}$$

където:

$V_L$  = обем на течността в стъклото (литри);

$C_L$  = концентрация на IC в течността (като въглерод в mg/l);

$V_H$  = обем на свободното пространство (литри);

$C_H$  = концентрация на IC в свободното пространство(като въглерод в mg/l).

Изчисляването на ПИС за двата аналитични метода, използвани за измерване на неорганичния въглерод в настоящото изпитване, е описано в по-долу в точки 60 и 61. Процентът на биоразграждане (% D) в единия и в другия случай се дава с формулата:

$$\%D = \frac{(\text{ПИС}_t - \text{ПИС}_b)}{\text{ТОС}} \times 100 \quad \text{Уравнение [2]}$$

където:

$\text{ПИС}_t$  = mg ПИС в стъклото за изпитване в момент t;

$\text{ПИС}_b$  = средно mg ПИС в контролните стъкла в момент t;

ТОС = mg ТОС добавен в началото в изпитвателния съд.

Процентът на биоразграждане % D се изчислява за изпитвателните ( $F_T$ ), референтните ( $F_C$ ) и, ако са включени, контролните стъкла за наблюдение на инхибирането ( $F_I$ ), като се вземат за изходни данни съответните количества общ неорганичен въглерод, получени към всеки момент на вземане на проби.

59. Ако има значително увеличаване на съдържанието на общ неорганичен въглерод на стерилните ( $F_S$ ) контроли през периода на изпитването, може да се направи заключението, че е настъпило абиотично разграждане на изпитвания химикал, което следва да се вземе предвид при изчисляването на D в уравнение [2].

**Ацидификация до pH < 3**

60. Тъй като ацидификацията до pH < 3 и уравнивяването водят до изравняване на концентрацията на общия неорганичен въглерод в течната и в газовата фаза, трябва да се измерва само концентрацията на неорганичния въглерод в газовата фаза. Поради това, от уравнение [1]  $\text{ПИС} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$ , където  $V_B$  = обем на стъклото за серум.

**Превръщане на CO<sub>2</sub> в карбонат**

61. При този метод изчисленията се извършват както в уравнение [1], но се игнорира пренебрежимо малкото количество неорганичен въглерод в газовата фаза, така че  $V_H \times C_H = 0$ , и  $PIC = V_L \times C_L$ .

**Изразяване на резултатите**

62. Построява се кривата на биоразграждането, като се нанася стойността на процента на биоразграждане D в зависимост от времето на инкубация, като се посочват, ако е възможно, латентната фаза, фазата на биоразграждане, 10-дневния период и фазата на плато, т.е. фазата, при която биоразграждането е максимално и в която биоразграждането се запазва на едно ниво. Ако са получени съпоставими резултати за съдовете F<sub>T</sub> от успоредното изпитване (< 20 % разлика), начертава се средната крива (вж. допълнение 2, фигура 1); ако не, начертава се крива за всеки съд. Определя се средната стойност на процента на биоразграждане във фазата на плато, или се оценява най-високата стойност (напр. когато кривата тръгва надолу във фазата на плато), но е важно да се прецени дали в този случай стойността не е извън серията. Това най-високо ниво на биоразграждане се посочва като „степен на биоразграждане на изпитвания химикал“ в доклада от изпитването. Ако броят на съдовете в изпитването не е достатъчен да се получи фаза на плато, данните, измерени в последния ден на изпитването се използват, за да се изчисли средна стойност. Последната стойност, средно от пет повторения, се използва за посочване на точността на определяне на процента на биоразграждане. В отчета се включва и стойността, получена в края на 10-дневния период.
63. По същия начин се построява и крива за референтния химикал F<sub>C</sub>, и, ако са включени F<sub>S</sub> и F<sub>I</sub> — съответно проверка за абиотичното разграждане и контрола за инхибиране, построяват се криви и за тях.
64. Количествата на общия неорганичен въглерод в контролните съдове без химикал (F<sub>B</sub>) се записват, както и онези в съдовете F<sub>S</sub> (проверка за абиотично разграждане), ако тези съдове са включени в изпитването.
65. Изчислява се D за съдовете F<sub>T</sub> въз основа на теоретичния добив на неорганичен въглерод, който се очаква само от референтния химикал в сместа. Ако на 28-ия ден  $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25 \%$ , може да се предположи, че изпитваният химикал е довел до инхибиране на действието на инокулума, и че ниските стойности на D<sub>FT</sub>, получени при условията на провеждане на изпитването, се дължат на това. В този случай изпитването може да се повтори, като се използва по-ниска изпитвателна концентрация и като се намали, за предпочитане, наличието на разтворен неорганичен въглерод в инокулума и на общия неорганичен въглерод в контролните съдове, тъй като иначе по-ниската концентрация на изпитвания химикал ще намали точността на метода. Като друга възможност може да се използва и друг инокулум. Ако в съд F<sub>S</sub> (абиотично разграждане) се наблюдава значително (> 10 %) повишаване на количеството на общия неорганичен въглерод, може да е протекъл процес на абиотично разграждане.

**Валидност на резултатите**

66. Изпитването се смята за валидно, ако:
- средният процент на разграждане в съдовете F<sub>C</sub>, съдържащи референтния химикал, е > 60 % към 14-ия ден на инкубацията; и
  - средното количество на общия неорганичен въглерод в контролните съдове F<sub>B</sub> в края на изпитването е > 3 mg C/l.

Ако тези граници не са спазени, изпитването трябва да се повтори с инокулум от друг източник и/или трябва да се преразгледат използваните процедури. Например, ако проблемът се състои във високия добив на неорганичен въглерод в контролните съдове, трябва да се следва процедурата, посочена в точки 27—32.

67. Ако изпитваният химикал не осигурява 60 % от максималната теоретична продукция на неорганичен въглерод и е доказано, че не оказва инхибиращо въздействие (вж. точка 65), изпитването може да се повтори с по-висока концентрация на инокулум (до 30 mg/l активна утайка и 100 ml изходящи води/l) или с инокулум от други източници, особено ако разграждането е било в интервала 20—60 %.

**Интерпретиране на резултатите**

68. В настоящото изпитване биоразграждане > 60 % от максималната теоретична продукция на неорганичен въглерод в рамките на 10-дневния период показва, че изпитваният химикал е лесно биоразградим при аеробни условия.
69. Ако не е достигнат прагът от 60 % максималната теоретична продукция на неорганичен въглерод, трябва да се определи стойността на pH на средата в стъклата, в които не е добавяна киселина или основа; стойност, по-ниска от 6,5, е указание за възможна нитрификация. В такъв случай изпитването се повтаря с буферен разтвор с по-висока концентрация.

<sup>(1)</sup> Процент на биоразграждане в съдовете F<sub>C</sub>, съдържащи референтното вещество.

<sup>(2)</sup> Процентът на разграждане в съдове F<sub>I</sub>.

**Доклад от изпитването**

70. Съставя се таблица за % на D за всяко изпитвателно ( $F_T$ ), референтно ( $F_C$ ) и, ако е включено, контролно стъкло за наблюдение на инхибирането ( $F_I$ ), за всеки ден, в който са вземани проби. Ако за стъклата с повторенията са получени съпоставими резултати, начертава се крива на средния % D в зависимост от времето. Записва се количеството на общия неорганичен въглерод в контролните съдове ( $F_B$ ) и в стерилните контролни съдове ( $F_S$ ), както и на разтворения органичен въглерод и/или други параметри, както и процентът на елиминирането им.
71. Определя се средната стойност на % D във фазата на плато, или се използва най-високата стойност, ако кривата на биоразграждането тръгва напред във фазата на плато, и тази стойност се отчита като „степен на биоразграждане на изпитвания химикал“. Важно да се гарантира, че в последния случай най-високата стойност не е извън кривата.
72. Докладът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

*Изпитван химикал:*

- общоприето наименование, химично наименование, номер по CAS, структурна формула и съответни физични и химични свойства,
- чистота (примеси) на изпитвания химикал.

*Условия, при които се извършва изпитването:*

- позоваване на настоящия метод за изпитване,
- описание на системата за извършване на изпитването (т.е., обем на съда за изпитването, съотношение между свободното пространство и течността, метод на разклащане и т.н.),
- прилагане на изпитвания и референтния химикал в системата за изпитване: използвана концентрация на изпитване и количество на дозираните във всяко опитно стъкло въглерод, използване на разтворители,
- данни за използвания инокулум, за възможно предварително третиране и предварителна подготовка,
- температура на инкубиране,
- валидиране на принципа на анализа на неорганичен въглерод,
- основни характеристики на използвания уред за анализиране на неорганичен въглерод (както и на всякакви други използвани методи за анализ),
- брой на повторенията.

*Резултати:*

- необработени данни и изчислени стойности на биоразградимостта под формата на таблица,
- графика на процента на разграждане в зависимост от времето за изпитвания и референтния химикал, латентната фаза, фазата на разграждане, 10-дневния период и наклона на кривата,
- процентът на елиминиране във фазата на плато, в края на изпитването и след 10-дневния период,
- причини за отхвърляне на резултатите от изпитването,
- други факти, които са важни по отношение на следваните процедури,
- обсъждане на резултатите.

## ПРЕПРАТКИ:

- (1) Глава В.4 от настоящото приложение, Определяне на пряката биологична разградимост — Метод за отделяне на CO<sub>2</sub> (метод В.4-В).
- (2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J.A., Oil Chem Soc.* 50: 159-167.
- (3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl Env. Microbiol.* 38: 1153-1161.
- (4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).
- (6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl Microbiol.* 30: 922-929.
- (9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801-812.
- (10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci.* 40: 181-185.
- (11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51-53.
- (12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233-243.
- (13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.
- (14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507-524.
- (15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527-1550.
- (16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO<sub>2</sub> headspace test).
- (17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO<sub>2</sub> biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent“ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219-3235.

- 
- (20) Глава В.4 от настоящото приложение, Определяне на пряката биологична разградимост
- (21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.
- (22) Глава В.11 от настоящото приложение, Изпитване за потискане дишането на активирана утайка.
- (23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.
- (24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO<sub>2</sub> method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) ISO 10634 (1996) 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.
-

## Допълнение 1

## СЪКРАЩЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**IC:** Неорганичен въглерод

**ThCO<sub>2</sub>:** Теоретичен въглероден диоксид (mg) е изчисленото количество въглероден диоксид, което ще се получи от известно или измерено съдържание на въглерод в изпитвания химикал, когато той бъде напълно минерализиран; изразява се също като mg въглероден диоксид, отделен от 1 mg от изпитвания химикал.

**DOC:** Разтворен органичен въглерод е органичният въглерод, присъстващ в разтвора, или който преминава през филтър от 0,45 микрометра, или остава в супернатанта след центрофугиране при около 4 000 g (около 40 000 m.s<sup>-2</sup>) за 15 min.

**DIC:** Разтворен неорганичен въглерод

**ThIC:** Теоретично съдържание на неорганичен въглерод

**TIC:** Общ неорганичен въглерод

**Лесно биоразградим:** Условна класификация на химикалите, които са преминали през определени пресяващи изпитвания за пълна биоразградимост; тези изпитвания са толкова строги, че се счита, че такива съединения бързо и напълно се разграждат биологично във водна среда при аеробни условия.

**10-дневен период:** 10-те дни, които непосредствено следват достигането на 10 % биоразграждане.

**Присъща биоразградимост:** Класификация на химикали, за които има неоспорими доказателства за биологично разграждане (първично или пълно) в което и да е изпитване за биоразградимост.

**Пълно аеробно биоразграждане:** Равнището на постигнато разграждане, когато изпитваният химикал е напълно усвоен от микроорганизмите и в резултат на това са произведени въглероден диоксид, вода, минерални соли и нови микробни клетъчни съставки (биомаса).

**Минерализация:** Минерализация е пълното разграждане на органичен химикал до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O при аеробни условия, и до CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O при анаеробни условия.

**Латентна фаза:** Периодът от началото на изпитването до момента на достигане на аклиматизиране и/или адаптация на разлагащите микроорганизми, и на осезаемо увеличаване на степента на биоразграждане на даден изпитван химикал или органична материя (напр. 10 % от максималното теоретично биоразграждане или по-нисък процент, в зависимост от точността на начина на измерване).

**Фаза на разграждане:** Времето от края на латентната фаза до времето, при което са достигнати 90 % от максималното равнище на разграждане.

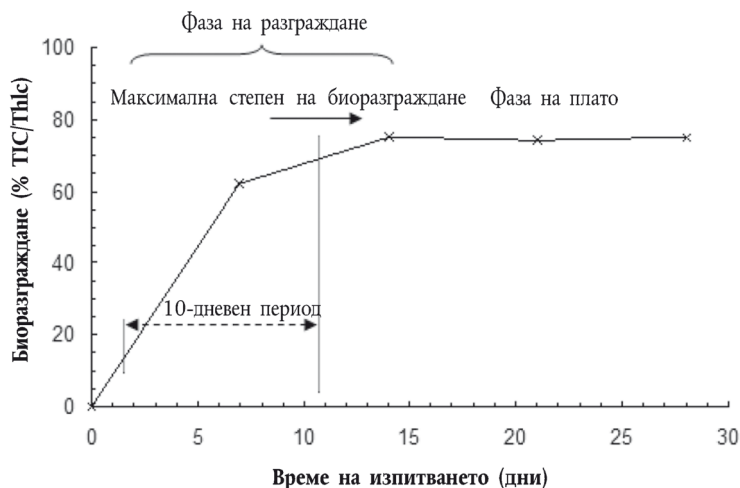
**Фаза на плато:** Фазата на плато е фазата, в която е достигнато максимално разграждане и кривата на биоразграждане е изравнена.

**Изпитван химикал:** Всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

## Допълнение 2

## Пример на крива на биоразграждане

Фигура 1

Биоразграждане на 1-октанол в изпитване за CO<sub>2</sub> в свободно пространство

Терминологичен справочник

Биоразграждане:

Фаза на разграждане:

Максимална степен на биоразграждане:

Фаза на плато:

10-дневен период:

Време на изпитването (дни)

### В.30. БИОАКУМУЛАЦИЯ В СУХОЗЕМНИ ОЛИГОХЕТИ

#### УВОД

1. Настоящият метод е еквивалентен на Насоките за изпитване (НИ) на ОИСП 317 (2010). Сред методите за изпитване във връзка със съдбата в околната среда, съответно през 1996 г. и 2008 г. бяха публикувани методите Биоконцентрация: проточен тест върху риби (глава В.13 от настоящото приложение (49) и „Биоаккумуляция в седиментните бентосни олигохети“ (53). Екстраполацията на данни за биоаккумуляцията във водна среда към сухоземни организми, напр. червеи, е трудна, ако изобщо е възможна. Изчисленията с помощта на модел, основан на липофилността на даден изпитван химикал, напр. (14) (37), понастоящем се използват за оценка на биоаккумуляцията на химикалите в почвата, като напр. в Техническото Ръководство на ЕС (19). Необходимостта от метод за изпитване, специфичен за средата, вече е била обект на проучване, напр. (55). Подобен метод е особено важен за оценката на вторичното отравяне в сухоземните хранителни вериги (4). В редица национални методи за изпитване, напр. в (2) и (72), се разглежда въпросът за биоаккумуляцията в различни от риба организми. Метод за измерване на биоаккумуляцията от замърсени почви в земни червеи (*Eisenia fetida*, Savigny) и енхитреиди е разработен от Американската асоциация за изпитвания и материали (ASTM) (3). Международно приет метод за определяне на биоаккумуляцията в почви с добавено вещество ще подобри оценката на риска от химикали в сухоземните екосистеми, напр. (25) (29).
2. Хранешите се с почва безгръбначни са изложени на химикали, налични в почвата. Сред тези животни, сухоземните олигохети играят важна роля за структурата и функционирането на почвите (15) (20). Сухоземните олигохети живеят в почвата и частично на повърхността ѝ (по-специално в торния слой); често те са най-разпространените видове, изразено като биомаса (54). Чрез смесване на съставките на почвата (биотурбация) и като служат за плячка на други животни, олигохетите могат да окажат силно влияние върху бионаличността на химикалите за други организми, като безгръбначни (напр. хищни паякообразни и бръмбари; напр. (64) или гръбначни (напр. лисици и чайки) хищници (18) (62). Някои видове сухоземни олигохети, които понастоящем се използват в екотоксикологичните изпитвания, са описани в допълнение 5.

3. В Ръководството на ASTM за извършване на лабораторни изпитвания за определяне на токсичността на почвата или биоаккумуляцията в земни червеи *Eisenia fetida* и енхитреиди *Enchytraeus albidus* (3) се съдържат множество важни и полезни данни за прилагането на изложения тук метод за изпитване на биоаккумуляцията в почвата. Други документи, които се споменават в настоящия метод за изпитване, са глава В.13 от настоящото приложение, озаглавена „Биоконцентрация: проточен тест за риби“ (49), и Насоки на ОИСР TG 315: „Биоаккумуляция в седиментните бентосни олигохети“ (53). Практическият опит по отношение на биоаккумуляцията в почвата и публикациите в научните издания, напр. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79), също са значим източник на информация за настоящия метод за изпитване.
4. Настоящият метод за изпитване е приложим главно по отношение на стабилни, неутрални органични химикали, които имат склонност за адсорбция в почвата. С настоящия метод за изпитване е възможно да се извършват изпитвания за биоаккумуляция на свързващи се с почвата стабилни органометални съединения. Той е приложим и към метали и други микроелементи.

#### НЕОБХОДИМИ УСЛОВИЯ

5. Изпитвания за измерване на биоаккумуляцията на химикали в сухоземни олигохети са били извършвани с тежки метали (вж. напр. (63)) и устойчиви органични химикали със стойности на  $\log K_{ow}$  между 3,0 и 6,0 (40). Подобни изпитвания са приложими и към:
  - химикали, при които  $\log K_{ow}$  е по-голямо от 6,0 (силно хидрофобни химикали),
  - химикали, принадлежащи към клас органични химикали, за който е известно, че има потенциал за натрупване в живи организми, напр., повърхностноактивни или силно адсорбиращи се химикали,
  - химикали, в чиято структура има указания за потенциал за биоаккумуляция, т.е., аналози на химикали с известен потенциал за биоаккумуляция, и
  - метали.
6. Преди започването на изследването следва да се събере информация за изпитвания химикал, напр. общоприето наименование, химично наименование (за предпочитане по IUPAC) структурна формула, номер по CAS, чистота, мерки за безопасност, правилни условия за съхранение и методи за анализ. Освен това следва да е известна и следната информация:
  - а) разтворимост във вода;
  - б) коефициент на разпределение октанол-вода,  $K_{ow}$ ;
  - в) коефициент на разпределение почва-вода, изразен като  $K_{oc}$ ;
  - г) парно налягане;
  - д) разградимост (напр. в почва или вода);
  - е) известни метаболити.
7. Могат да се използват белязани или небелязани с радиоактивен изотоп изпитвани химикали. Въпреки това, за да се улесни анализът, препоръчва се да се използва белязан изпитван химикал. Решението за това се взема в зависимост от границите на откриване или на необходимостта да се измерват изходният изпитван химикал и метаболитите му. Ако се използва белязан с радиоактивен изотоп химикал и се измерват общите радиоактивни остатъци, важно е белязаните остатъци в почвата и в опитните организми да се характеризират по отношение на процента съответно на изходния изпитван химикал и на белязания неизходен химикал, т.е., в пробите, взети при стационарно състояние или в края на фазата на поглъщане, за да може да се пресметне коефициентът на биоаккумуляция (BAF) за изходния изпитван химикал и за значимите почвени метаболити (вж. точка 50). Може да се наложи описаният тук метод да бъде изменен, напр. с оглед на получаването на достатъчно количество биомаса за измерване на небелязани с радиоактивен изотоп органични изпитвани химикали или метали. Ако се измерват общите радиоактивни остатъци (чрез течно скитилационно броене след извличане, изгаряне или разтваряне на тъкани), то BAF се базира на изходния изпитван химикал и метаболитите му. Изчисляването на BAF за предпочитане се прави въз основа на концентрацията на изходния изпитван химикал в организмите и на общите радиоактивни остатъци. След това се изчислява коефициентът на биоаккумуляция биота-почва (BSAF), нормализиран по отношение на съдържанието на липиди на червеите и на съдържанието на органичен въглерод (OC) в почвата, като се взема за основа BAF, за да се осигури съпоставимост между резултатите от различни изпитвания за биоаккумуляция.



8. Токсичността на изпитвания химикал спрямо използваните в изпитването видове следва да бъде известна, например ефективна концентрация (EC<sub>50</sub>) или леталната концентрация (LC<sub>50</sub>) за времето на фазата на поглъщане (напр. (19)). Избраната концентрация на изпитвания химикал следва да бъде около 1 % от острата асимптотична LC<sub>50</sub> и поне 10 пъти по-висока от границата на откриване на изпитвания химикал в почвата чрез използвания метод за анализ. Следва да се предпочитат, ако такива са налице, стойности на токсичността, изведени от дългосрочни изследвания върху сублетални крайни точки (51) (52). Ако не са налични такива данни, полезна информация може да се получи с изпитване за остра токсичност (вж. напр. (23)).
9. Следва да е наличен подходящ метод за анализ, чиито точност, прецизност и чувствителност при количественото определяне на химикала в изпитвателните разтвори, в почвата и в биологичния материал, са известни, както и подробни данни за подготовката на пробата и нейното съхранение, а също и информационните листове за безопасност на веществата. Аналитичните граници на откриване на изпитвания обект в почвата и в тъканите на червеите трябва също да са известни. Когато се използва изпитван химикал, белязан с <sup>14</sup>C, трябва да се познава специфичната радиоактивност (т.е., Bq mol<sup>-1</sup>) и процентът радиоактивност, свързан с примесите. Специфичната радиоактивност на изпитвания химикал следва да бъде достатъчно висока с оглед на улесняване на анализа, а използваните концентрации на изпитване да не предизвикват токсично въздействие.
10. Изпитването може да се извърши с изкуствена почва или с естествени почви. Преди започване на изпитването (3) (48) трябва да е налична информация за характеристиките на използваните естествени почви, т.е., за произхода на почвата или съставките ѝ, за рН, съдържанието на органичен въглерод, зърнометричния състав (процентно съдържание на пясък, прах и глина) и за способността ѝ за задържане на вода (СЗВ).

#### ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. Параметрите, които характеризират биоаккумуляцията на изпитвания химикал, включват коефициента на биоаккумуляция (BAF), константата на скоростта на поглъщане (k<sub>s</sub>) и константата на скоростта на елиминиране (k<sub>e</sub>). Определенията са дадени в допълнение 1.
12. Изпитването се състои от две фази: фаза на поглъщане (експозиция) и фаза на елиминиране (след експозиция). По време на фазата на поглъщане идентични групи червеи се експонират на почва, в която е добавен изпитваният химикал. Освен изпитваните животни, има и контролни групи от червеи, които се държат при идентични условия, но без изпитвания химикал. Измерват се сухото тегло и съдържанието на липиди на опитните организми. Това може да се извърши с червеите от контролната група. Като се анализират проби от червеите от контролните групи и от почвата, могат да се получат аналитичните контролни стойности. За фазата на елиминиране червеите се прехвърлят в почва, несъдържаща изпитвания химикал. Фазата на елиминиране е необходима във всички случаи, освен ако поглъщането на химикала по време на фазата на експозиция е било незначително. Фазата на елиминиране дава информация за скоростта, при която изпитваният химикал се екскретира от изпитвания организъм (напр. (27)). Ако по време на фазата на поглъщане не бъде достигнато стационарно състояние, определянето на кинетичните параметри — кинетичният коефициент на биоаккумуляция BAF<sub>k</sub>, константата/ите на скоростта на поглъщане и елиминиране — следва да се основават за предпочитане на едновременното коригиране на резултатите от фазите на поглъщане и елиминиране. Концентрацията на изпитвания химикал във/върху червеите се следи по време на цялото изпитване в двете му фази.
13. По време на фазата на поглъщане измерванията се правят при вземането на проби до 14 дни (енхитреиди) или до 21 дни (земни червеи), докато не бъде достигнато стационарно състояние (11) (12) (67). Стационарното състояние е достигнато, когато кривата на концентрацията в червеите като функция на времето стане успоредна на оста на времето, и три последователни анализа на концентрацията, извършени върху проби, взети на интервали от най-малко два дни, не се различават с повече от 20 % един от друг, въз основа на статистически сравнения (напр., анализ на дисперсията, регресионен анализ).
14. Фазата на елиминиране се състои в прехвърляне на изпитваните организми в съдове, които съдържат същия субстрат, но без изпитвания химикал. По време на фазата на елиминиране измерванията се правят при вземането на проби в продължение на 14 дни (енхитреиди) или 21 дни (земни червеи), освен ако по-ранно аналитично определяне не е показало намаляване с 90 % на остатъчните вещества от изпитвания химикал в червеите. Концентрацията на изпитвания химикал в червеите в края на фазата на елиминиране се отчита като неелиминирани остатъчни вещества. За предпочитане е коефициентът на биоаккумуляция в стационарно състояние (BCF<sub>ss</sub>) да се изчислява както като съотношение между концентрацията в червеите (C<sub>a</sub>) и концентрацията в почвата (C<sub>s</sub>) при видимо стационарно състояние, така и като кинетичен коефициент на биоаккумуляция BAF<sub>k</sub>, т.е., като съотношение между константата на скоростта на поглъщане от почвата (k<sub>s</sub>) и константата на скоростта на елиминиране (k<sub>e</sub>) (вж. допълнение 1 за определения), като се предполага кинетика от първи порядък (вж. допълнение 2 за изчислението). Ако не може да се приложи кинетика от първи порядък, следва да се използват други модели.
15. Константата на скоростта на поглъщане, константата на скоростта на елиминиране (или константите, когато се използват други модели), кинетичният коефициент на биоаккумуляция (BAF<sub>k</sub>), и, когато е възможно, доверителните граници на всеки един от тези параметри, се изчисляват с помощта на уравненията от информатизирания модел (вж. допълнение 2 за насоки). Пригодността на даден модел може да се определи, напр. от корелационния коефициент или от коефициента на определяне (коефициенти, чиито стойности са близки до единица, показват добра пригодност) или от закона за хи-квадрат. Също така, за пригодността на модела може да съди от големината на стандартната грешка или доверителните интервали около очакваните параметри.
16. За да се намали варирането на резултатите от изпитването на химикали с висока липофилност, коефициентите на биоаккумуляция следва да се изразяват по отношение на съдържанието на липиди и съдържанието на органичен въглерод (съдържание в kg на органичен въглерод (OC) в почвата върху съдържание в kg-1 на липиди в червеите). Този подход се основава на факта, че за някои класове химикали има ясна връзка между потенциала

за биоаккумуляция и липофилността; тази връзка е добре изяснена при риби (47). Има връзка между съдържанието на липиди в рибата и биоаккумуляцията на такива химикали. За бентосните организми е установена сходна корелация, напр. (30) (44). Също така, тази корелация е установена за сухоземните олигохети, напр. (5) (6) (7) (14). Ако е налице достатъчно количество тъкан от червеи, липидното съдържание на изпитваните животни може да се определи върху същия биологичен материал, който се използва за определяне на концентрацията на изпитвания химикал. Друга възможност е да се използват контролни животни за определяне на съдържанието на липиди.

#### ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

17. За да бъде изпитването валидно, следва да са изпълнени следните критерии както при контролните, така и при третираните животни:

— В края на изпитването, общата смъртност по време на фазата на поглъщане и фазата на елиминиране не трябва да надвишава 10 % (земни червеи) или 20 % (енхитреиди) от общия брой въведени червеи.

— За *Eisenia fetida* и *Eisenia Andrei*, средната загуба на маса, измерена в края на фазата на поглъщане и в края на фазата на елиминиране, не трябва да надвишава 20 % от началната маса (f.w.) в началото на всяка от фазите.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Животински видове за изпитването

18. За изпитването за биоаккумуляция се препоръчват няколко вида сухоземни олигохети. Най-често използваните видове — *Eisenia fetida* или *Eisenia andrei* (Lumbricidae), или *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus*, или *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae) — са описани в допълнение 5.

##### Апаратура

19. Трябва внимателно да се избягва използването на материали за всички части от оборудването, които могат да разтворят или адсорбират изпитвания химикал, или да освободят друг химикал и да окажат неблагоприятно въздействие върху изпитваните животни. Могат да се използват стандартни правоъгълни или цилиндрични резервоари, изработени от химически инертен материал и с подходящ капацитет, които съответстват на степента на зареждане, т.е. на броя на червеите. За оборудването, което влиза в контакт с изпитвателната среда, могат да се използват неръждаема стомана, пластмаса или стъкло. Съдовете за изпитване следва да са затворени по подходящ начин, за да се предотврати излизането на червеите, но като се осигурява достатъчен приток на въздух. За химикали с висок коефициент на адсорбция, като синтетични пиретроиди например, може да се наложи използването на силанизирани стъкла. В такива ситуации оборудването трябва да се изхвърли след употреба (49). Трябва да се предотврати изпаряването на белязани с радиоактивен изотоп и летливи изпитвани обекти. Следва да се използват уловители (напр. стъклени бутилки за промиване на газове), които съдържат подходящи абсорбенти за задържане на остатъците, изпаряващи се от изпитвателните съдове.

##### Почва

20. Използваната в изпитването почва трябва да е с качество, което да позволява оцеляването и, за предпочитане, възпроизводството на изпитваните организми по време на периодите на аклиматизация и изпитване, без те да показват необичаен външен вид или поведение. Червеите трябва да могат да се зароят в почвата.
21. За субстрат при изпитванията се препоръчва да се използва изкуствената почва, описана в глава В.8 от настоящото приложение (48). Приготвянето на изкуствената почва за използване в изпитванията за биоаккумуляция, както и препоръки за съхраняването ѝ, са посочени в допълнение 4. Изсушена на въздух изкуствена почва може да се съхранява при стайна температура, докато не бъде използвана.
22. Естествени почви от незамърсени места обаче могат да бъдат използвани в изпитванията или при отглеждане на червеите. Естествените почви следва да бъдат характеризирани най-малко по отношение на произхода им (място, от което са взети), рН, съдържание на органичен въглерод, зърнометричен състав (процент на пясък, прах и глина), максимална способност за задържане на вода (СЗВмакс) и процент на съдържание на вода (3). Ползена информация преди използването на почвата може да се получи от анализа на почвата или на компонентите ѝ за микрозамърсители. Ако се използва почва от селскостопанска земя, тя не трябва да е третирана с продукти за растителна защита или да е наторявана с оборска тор от третирани животни най-малко една година, или с органични торове най-малко шест месеца преди вземането на пробата (50). Процедурите по боравене с естествената почва преди използването ѝ в лабораторни изпитвания за екотоксичност са описани в (3). За естествените почви времето на съхранение в лаборатория следва да бъде възможно най-кратко.

##### Прилагане на изпитвания химикал

23. Изпитваният химикал се смесва с почвата. Следва да се вземат предвид физичните и химичните свойства на изпитвания химикал. Разтворимите във вода изпитвани химикали следва да се разтворят изцяло във вода, преди да бъдат смесени с почвата. Препоръчаната процедура за добавянето за малко разтворимите във вода изпитвани химикали включва покриване на една или повече от една от съставките на (изкуствената) почва с изпитвания химикал. Например, кварцовият пясък, или част от него, може да бъде накснат в разтвор на изпитвания химикал в подходящ органичен разтворител, който след това бавно се изпарява до изсушаване. След това така

подготвената част се смесва с влажната почва. Основното предимство на тази процедура е, че не се въвежда разтворител в почвата. Когато се използва естествена почва, изпитваният химикал може да се прибави чрез добавяне в част от почвата, изсушена с въздух, както е описано по-горе за изкуствената почва, или чрез размесване с влажната почва с последващо изпаряване, ако е използван разтварящ агент. Като цяло, контактът на влажна почва с разтворители следва да се избягва в рамките на възможното. Следва да се вземе предвид следното (3):

- ако се използва разтворител, различен от вода, той трябва да може да се смесва с вода и/или да може да бъде елиминиран (напр. изпарен), като в почвата остане само изпитваният химикал,
  - ако се използва контрола за разтворителя, няма нужда от отрицателна контрола. Контролата за разтворителя следва да съдържа най-високата концентрация на разтворителя, добавен в почвата, като използваният разтворител трябва да бъде от същата партида, от която е приготвен изходният разтвор. Токсичността и летливостта на разтворителя, а също и разтворимостта на изпитвания химикал в избрания разтворител са главните критерии за избор на подходящ подпомагащ разтваряне агент.
24. За малко разтворимите във вода и в органични разтворители химикали, 2,0—2,5 g фино стрит кварцов пясък на изпитвателен съд могат да се смесят с количеството изпитван химикал, напр. като се използват хаванче и чукче, така че да се получи желаната концентрация за изпитването. Сместа от кварцов пясък и изпитван химикал се добавя в предварително навлажнената почва и старателно се смесва с подходящо количество дейонизирана вода, за да се получи необходимото съдържание на влага. Крайната смес се разпределя по съдовете за изпитване. Процедурата се повтаря за всяка изпитвателна концентрация, и се приготвя и подходяща контролна проба от 2,0—2,5 g фино стрит кварцов пясък за всеки изпитвателен съд.
25. Концентрацията на изпитвания химикал в почвата трябва да бъде определена след добавянето му. Преди въвеждането на изпитваните организми следва да бъде проверено хомогенното разпределение на изпитвания химикал в почвата. Методът, използван за добавяне на химикала, както и аргументите за избор на конкретна процедура за добавяне, следва да бъдат докладвани (24).
26. Преди въвеждането на организмите би било най-добре, ако е установено равновесие между почвата и фазата пори-вода; препоръчва се период от четири дни при 20 °C. За множество малко разтворими във вода органични химикали времето, необходимо за достигане на истинско равновесие между адсорбираните и разтворените фракции, може да се измерва в дни или месеци. В зависимост от целите на изследването, например когато трябва да се наподобят условията на околната среда, почвата с добавката може да „отлежава“ по-дълъг период, напр. три седмици при 20 °C (22) за метали.

#### Отглеждане на изпитваните организми

27. Червеите трябва за предпочитане да се държат в условията на непрекъснато отглеждане в лаборатория. Насоки за методите на отглеждане в лаборатория за *Eisenia fetida* и *Eisenia andrei*, както и за видовете енхитреиди, се дават в допълнение 5 (вж. също и (48) (51) (52)).
28. Червеите, които се използват при изпитванията, не трябва да страдат от никакви видими болести, отклонения и паразити.

#### ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

29. Изпитваните организми се излагат на въздействието на изпитвания химикал по време на фазата на поглъщане. Фазата на поглъщане следва да продължава 14 дни (енхитреиди) или 21 дни (земни червеи), освен ако не се установи, че стационарното състояние е постигнато.
30. За фазата на елиминиране червеите се прехвърлят в почва, несъдържаща изпитвания химикал. Първата проба се взема от 4 до 24 часа след началото на фазата на елиминиране. В допълнение 3 са дадени примери за схеми за вземане на проби при фаза на поглъщане с продължителност 21 дни и при фаза на елиминиране с продължителност 21 дни.

#### Изпитвани организми

31. При много видове сухоземни енхитреиди индивидуалното тегло е много малко (напр. 5—10 mg влажно тегло на индивид за *Enchytraeus albidus* и по-малко за *Enchytraeus crypticus* или *Enchytraeus luxuriosus*); за да се осъществи измерване на теглото и химически анализ, може да се наложи да се съберат червеите в съдовете за повторенията (т.е., всички червеи от отделен съд за повторение ще бъдат използвани за получаване на един аналитичен резултат за тъкан). 20 отделни енхитреиди се добавят във всеки отделен съд за повторение, като следва да се използват най-малко три отделни повторения. Ако границата на аналитично откриване на изпитвания химикал е висока, може да са необходими повече червеи. За използвани в изпитванията видове с по-високо индивидуално тегло (*Eisenia fetida* и *Eisenia andrei*), съдовете за повторение могат да съдържат по един индивид.
32. Земните червеи, използвани в изпитване, следва да имат сходно тегло (напр. *Eisenia fetida* и *Eisenia andrei* следва да имат индивидуално тегло 250—600 mg). Енхитреидите (напр. *Enchytraeus albidus*) следва да имат дължина приблизително 1 cm. Всички червеи, използвани в дадено изпитване, следва да идват от един и същ източник, и да бъдат възрастни индивиди с клителум (вж. допълнение 5). Тъй като теглото и възрастта на

животното могат да имат отражение върху стойността на ВАФ (напр. поради различното съдържание на липиди и/или наличието на яйца), тези параметри следва да се отбелязват грижливо и да се вземат предвид при тълкуването на резултатите. Освен това, по време на периода на експозиция може да се появят пашкули, което също има отражение върху стойностите на ВАФ. Препоръчва се проба от проба от опитните червеи да се измери преди изпитването, за да се прецени средното влажно и средното сухо тегло.

33. Следва да се използва висок коефициент почва/червеи, за да се ограничи до минимум намаляването на концентрацията на изпитвания химикал в почвата по време на фазата на поглъщане. За *Eisenia fetida* и *Eisenia andrei* се препоръчва минимално количество от 50 g сухо тегло (с.т.) почва на червей, а за енхитреидите — минимално количество от 10—20 g с.т. почва на изпитвателен съд. Съдовете следва да съдържат слой почва от 2—3 cm (енхитреиди) или 4—5 cm (земни червеи).
34. Червеите, използвани при изпитване, се изваждат от средата за отглеждане (напр. за енхитреидите се използва златарска пинсета). Възрастните организми се прехвърлят в нетретирана изпитвателна почва за аклиматизиране и се хранят (вж. точка 36). Ако условията на изпитването се различават от условията на отглеждане, фаза от 24—72 h следва да е достатъчна за адаптирането на червеите към условията на изпитване. След аклиматизирането, земните червеи се изплакват чрез прехвърляне в стъклени блюда (напр. стъкло на Петри), съдържащи чиста вода, след което се претеглят преди да бъдат поставени в почвата, предназначена за изпитването. Преди претеглянето следва да се отстрани излишната вода от червеите, като те внимателно се допират до ръба на стъклото или като се попие водата от тях с помощта на леко влажна хартиена кърпа.
35. Поведението на червеите по отношение на заравянето в почвата следва да се наблюдава и регистрира. При изпитванията с дъждовни червеи, животните (контролни и третираните) обикновено се заравят в почвата до няколко часа; това следва да се провери не по-късно от 24 h след добавянето на червеите в изпитвателните съдове. Ако земните червеи не се заравят в почвата (напр. повече от 10 % за повече от половината от фазата на поглъщане), това означава, че условията на изпитването не са подходящи или че изпитваните организми не са здрави. В такъв случай изпитването трябва да се прекрати и повтори. Енхитреидите живеят главно в пространствата между частиците на почвата и повърхността на тялото им не е в постоянен контакт с околния субстрат; експозицията на енхитреидите в почвата и експозицията на тези на повърхността се смята за равностойна, и фактът, че те не се заравят, не налага непременно повтаряне на изпитването.

#### Хранене

36. Когато се използва почва с ниско съдържание на общ органичен въглерод, следва да се разгледа възможността за хранене. Когато се използва изкуствена почва, за земни червеи се препоръчва хранене веднъж седмично (т.е., червеите да се хранят един път на седмица) със 7 mg изсушен оборски тор на грам почва (сухо тегло), а за енхитреиди се препоръчва седмична дажба от 2—2,5 mg смлени овесени ядки на грам почва (сухо тегло) (11). Първата дажба храна се смесва с почвата непосредствено преди добавянето на изпитваните организми. За предпочитане е да се използва същият вид храна като в средата за отглеждане (вж. допълнение 5)

#### Светлина и температура

37. Изпитванията следва да се провеждат при контролиран цикъл от 16 часа светлина и 8 часа тъмнина, при светлинен интензитет в участъка с изпитвателните съдове за предпочитане от 400 до 800 lx. Температурата при изпитване трябва да бъде  $20 \pm 2$  °C по времето на цялото изпитване.

#### Концентрации на изпитване

38. Използва се една-единствена концентрация. Ситуациите, при които се изискват допълнителни концентрации, трябва да се обосноват. Ако токсичността на изпитвания химикал (ЕС<sub>50</sub>) е близка до аналитичната граница на откриване, препоръчва се използването на белязан изпитван химикал с висока специфична радиоактивност. За металите концентрацията трябва да бъде над фоновото равнище в тъканите и почвата.

#### Повторения

39. По отношение на измерванията на кинетичните параметри (фази на поглъщане и на елиминирание), минималният брой на третираните съдове за повторения следва да бъде три за всеки момент на вземане на проби. Общият брой подготвени съдове за повторения следва да бъде достатъчен да се осигурят проби за всички моменти на вземане на проби през фазите на поглъщане и на елиминирание.
40. За биологичните наблюдения и измервания (напр. съотношението сухо/влажно тегло, съдържание на липиди) и за анализа на фоните концентрации в червеите и в почвата се осигуряват най-малко 12 съда за повторения с негативна контрола (четири се вземат за проба в началото на фазата на поглъщане, четири — в края ѝ, и четири на края на фазата на елиминирание), ако не е използван друг разтворител, освен вода. Ако за прилагането на изпитвания химикал е използван някакъв подпомагач разтваряне агент, следва да се извърши, в допълнение към третираните повторения, контрол за разтворителя (вземат се проби от четири съда за повторения в началото на фазата на поглъщане, четири — в края ѝ, и четири на края на фазата на елиминирание) с всички съставки, с изключение на изпитвания обект. В този случай може да се осигурят още четири допълнителни съда за повторения с негативна контрола (без разтворител) за незадължително вземане на проби в края на фазата на поглъщане. Тези повторения може да се сравнят биологично със съдовете за контрол за разтворителя, за да се добие информация за възможното влияние на разтворителя върху изпитваните организми. Препоръчва се да се подготвят достатъчно допълнителни запасни съдове за повторения (т.е., осем) за третираните и за контролните организми.

**Честота на измерване на качеството на почвата**

41. рН на почвата, съдържанието на влага в нея и (постоянната) температура в помещението, в което се извършва изпитването, се измерват в началото и в края на фазата на поглъщане и на фазата на елиминиране. Веднъж седмично съдържанието на влага в почвата се контролира, като се претеглят съдовете, в които се извършва изпитването, и се сравняват получените стойности с първоначалното им тегло им при започване на изпитването. Загубата на вода следва да се компенсира чрез добавяне на дейонизирана вода.

**Вземане на проби и анализ на червеите и почвата**

42. В допълнение 3 е посочена примерна схема за вземане на проби за фазите на поглъщане и елиминиране в изпитване за биоаккумуляция при земни червеи и енхитреиди.
43. Проба от почвата от изпитвателните съдове за определяне на концентрацията на изпитвания химикал се взема преди добавянето на червеите и по време на фазата на поглъщане и на фазата на елиминиране. По време на изпитването се определя концентрацията на изпитвания химикал в червеите и в почвата. По принцип, измерват се общите концентрации в почвата. Възможно е също да се измерва концентрацията на водата в порите; в този случай преди започването на изследването трябва да се представят обосновка и подходящи методи и същите следва да се включат в отчета за изследването.
44. Вземат се най-малко шест проби от почвата и червеите по време на фазите на поглъщане и елиминиране. Ако е доказана стабилността на изпитвания химикал, броят на анализите на почвата може да се намали. Препоръчва се да се анализират най-малко три повторения в началото и в края на фазата на поглъщане. Ако концентрацията в почвата, измерена в края на фазата на поглъщане, се различава от началната с повече от 30 %, почвените проби, взети на други дати, също следва да бъдат анализирани.
45. Червеите от дадено повторение се изваждат от почвата при всяко вземане на проба (напр. след разстилане на почвата от повторението в плитък съд и изваждане на червеите с помощта на мека златарска пинсета), бързо се изплакват с вода в плитък стъклен или стоманен съд. Излива се излишната вода (вж. точка 34). Червеите внимателно се прехвърлят в предварително претеглен съд и незабавно се претеглят, включително и чревното съдържимо.
46. Земните червеи (*Eisenia* sp.) следва да се оставят да изхвърлят чревното си съдържимо в течение на една нощ, напр. върху влажна филтърна хартия в покрито стъкло на Петри (вж. точка 34). След изхвърлянето, следва да се определи теглото на червеите, за да се оцени възможното намаляване на биомасата в процеса на изпитването (вж. критериите за валидност в точка 17). Претеглянето и анализът на тъканите на енхитреидите се извършва без изхвърляне на чревното съдържимо, тъй като това е трудно от техническа гледна точка, поради малките размери на тези червеи. След окончателното определяне на теглото, червеите следва незабавно да се умъртвят, като се използва най-подходящият метод (напр. с течен азот, или чрез замразяване при температура под  $-18^{\circ}\text{C}$ ).
47. По време на фазата на елиминиране, червеите заместват замърсеното чревно съдържимо с чиста почва. Това означава, че измерванията, извършени върху червеи, които не са изхвърлили чревното си съдържимо (в случая енхитреиди), от които са взети проби непосредствено преди фазата на елиминиране, включват замърсена почва от чревното съдържимо. За водните олигохети се приема, че след първите 4—24 h от фазата на елиминиране, по-голямата част от замърсеното чревно съдържимо е заменена от чист седимент, (вж. напр. (46)). Подобни констатации са направени за земни червеи в рамките на изследвания за акумулация на белязани цинк и кадмий (78). При енхитреиди с неизхвърлено чревно съдържимо концентрацията на тази първа проба от фазата на елиминиране може да се смята за концентрация в тъканите след изхвърляне на чревното съдържимо. За да се вземе предвид разреждането на концентрацията на изпитвания обект от незамърсената почва по време на фазата на елиминиране, теглото на чревното съдържимо може да се оцени от съотношенията влажно тегло/тегло на пепелта на червеите или сухо тегло/тегло на пепелта на червеите.
48. Желателно е пробите от почвата и червеите да се анализират веднага след вземането на проба (т.е. в рамките на 1—2 дни) с цел да се избегне разлагането или други загуби, като освен това се препоръчва да се изчислят приблизителните скорости на поглъщане и елиминиране, докато изпитването продължава. Ако анализът се забави, пробите следва да се съхраняват с помощта на подходящ метод, напр., дълбоко замразяване ( $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ).
49. Следва да се провери дали прецизността и възпроизводимостта на химическия анализ, както и дали аналитичният добив на изпитвания химикал от пробите от почвата и от червеите са задоволителни за дадения метод; следва да се отчетат ефективността на екстракция, границата на откриване (LOD) и границата на количествено определяне (LOQ). Подобно, следва да се провери дали изпитваният химикал не е откриваем в контролните съдове в концентрация, които са по-високи от фона. Когато концентрацията на изпитвания химикал в опитния организъм  $C_a > 0$  в контролните червеи, тя трябва да се включи в изчисляването на кинетичните параметри (вж. допълнение 2). С всички проби следва да се борави по начин, който намалява до минимум замърсяването и загубите (които напр. могат да се получат при адсорбция на изпитвания химикал от устройството за вземане на проба).

50. Когато се работи с белязани с радиоактивен изотоп химикали, възможно е да се анализират изходни химикали и техните метаболити. Количественото определяне на изходния изпитван химикал и на метаболитите при стационарно състояние или в края на фазата на поглъщането е източник на важна информация. След това пробите следва да се „почистят“, така че изходният изпитван химикал да може да бъде количествено определен отделно. Ако отделни метаболити надхвърлят 10 % от общата радиоактивност в анализирания проба(и), препоръчва се идентифициране на тези метаболити.
51. Общият добив и добивът на изпитвания химикал от червеите, почвата, и ако са използвани, от уловителите, съдържащи абсорбенти за улавяне на изпарения изпитван химикал, следва да се регистрират и отчетат.
52. Събирането на индивиди, взети като проба от даден изпитвателен съд, се допуска за енхитреиди, които са по-малки от земните червеи. Ако събирането предполага намаляване на броя на повторенията, това ограничава статистическите процедури, които могат да се приложат към данните. Ако се изискват конкретни статистическа процедура и мощност, тогава в изпитването се включват достатъчен брой изпитвателни съдове за повторения, за приспособяване към желаното обединяване, процедура и мощност.
53. Препоръчва се BAF да се изразява едновременно като функция на общото сухо тегло, и, когато е необходимо (т.е. за силно хидрофобни химикали), като функция на липидното съдържание. За определянето на липидното съдържание следва да се използват подходящи методи (някои съществуващи методи — напр. (31) и (58) — следва да се адаптират за тази цел). В тези методи се използва техника за екстракция с хлороформ/метанол. За да се избегне употребата на хлорирани разтворители обаче, следва да се използва измененият метод на Bligh и Dyer (9), описан в (17). Тъй като различните методи могат да не дадат идентични стойности, важно е да се дадат подробности за използвания метод. Когато е възможно, т.е., ако е налице достатъчно тъкан от червеи, анализът за липиди в най-добрия случай се прави върху същата проба или същия екстракт като използвания за анализа за изпитвания химикал, понеже липидите често трябва да се отстраняват от екстракта, преди той да бъде анализиран хроматографски (49). Друга възможност е да се използват контролни животни за определяне на съдържанието на липиди и получената стойност да се използва за нормализиране на стойностите на BAF. Последният подход намалява замърсяването на оборудването с изпитвания химикал.

#### ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

##### Обработка на резултатите

54. Кривата на поглъщането на изпитвания химикал се получава чрез начертване на неговата концентрация във/върху червеите във фазата на поглъщането спрямо времето в аритметични скали. Когато кривата достигне до плато или стационарно състояние, (вж. определенията в допълнение 1), коефициентът на биоаккумуляция при стационарно състояние BAF<sub>ss</sub> се изчислява от формулата:

$$\frac{C_a \text{ в стационарно състояние или в края на фазата на поглъщане (средно)}}{C_s \text{ в стационарно състояние или в края на фазата на поглъщане (средно)}}$$

$C_a$  е концентрацията на изпитвания химикал в изпитвания организъм

$C_s$  е концентрацията на изпитвания химикал в почвата

55. Когато не е достигнато стационарно състояние, въз основа на константите на скоростта вместо BAF<sub>ss</sub> се изчислява BAF<sub>K</sub>, както е описано по-долу:

— Определя се коефициентът на акумулация (BAF<sub>K</sub>) като съотношението  $k_s/k_e$ .

— Скоростите на поглъщане и елиминиране се изчисляват за предпочитане едновременно (вж. уравнение 11 в допълнение 2).

— Константата на скоростта на елиминиране ( $k_e$ ) обикновено се определя чрез кривата на елиминиране (т.е., графика на концентрацията на изпитвания обект в червеите по време на фазата на елиминирането). След това се изчислява константата на скоростта на поглъщане  $k_s$  при дадени  $k_e$  и стойност на  $C_a$ , която се получава от кривата на поглъщането — вж. приложение 2 за описание на тези методи. Предпочитаният метод за получаване на BAF<sub>K</sub> и константите за скорост  $k_s$  и  $k_e$ , е да се използват нелинейни параметрични изчислителни методи на компютър. Ако е очевидно, че към елиминирането не може да се приложи кинетика от първи порядък, следва да се използват по-сложни модели.

##### Протокол от изпитването

56. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

*Изпитван химикал:*

- всяка налична информация относно острата или дългосрочната им токсичност (напр.  $EC_{50}$ ,  $LC_{50}$ , NOEC) на изпитвания химикал към обитаващи почвата олигохети,
- чистота, физична природа и физични и химични свойства — напр.  $\log K_{ow}$ , разтворимост във вода,
- данни за неговата химична идентификация; източник на изпитвания обект, идентичност и концентрация на използвания разтворител, ако има такъв,
- ако е използван белязан с радиоактивен изотоп химикал, точно положение на белязаните атоми, специфичната радиоактивност и радиохимичната чистота.

*Животински вид за изпитването:*

- научно име, порода, източник, всякаква предварителна обработка, аклиматизация, възраст, обхват на размера и т.н.

*Условия на изпитването:*

- използвана процедура на изпитване,
- тип и характеристики на използваното осветление и фотопериода(ите),
- план на изпитването (например брой и размер на съдовете за изпитване, маса на почвата и дебелина на почвения слой, брой на повторенията, брой на изпитвателните концентрации, време на поглъщане и време на елиминиране, честота на вземане на проби),
- обосновката за избора на материала на изпитвателните съдове,
- метод за приготвяне на изпитвания обект и метод за прилагането му, обосновка на избора на конкретен метод,
- номинални концентрации на изпитване, средни величини на измерените стойности и техните стандартни отклонения в изпитвателните съдове и метод, по който са получени тези величини,
- източник на съставките на изкуствената почва или — ако е използвана естествена среда — произход на почвата, описание на предварителната подготовка, резултати от контролите (преживяване, увеличение на биомасата, възпроизводство) характеристики на почвата (pH, съдържание на общ органичен въглерод, зърнометричен състав (процент пясък, прах и глина), максимална способност за задържане на вода, процент вода в началото и в края на изпитването, други извършени измервания),
- подробна информация за обработката на пробите почва и червеи, включително подробности за процедурите по изготвяне, съхранение, добавяне на изпитвания обект, екстракция и аналитични процедури (в това число и прецизност) за изпитвания обект в червеите и почвата и липидното съдържание (ако се измерва), както и добива на изпитвания обект.

*Резултати:*

- смъртност на контролните червеи и на червеите във всеки изпитвателен съд и всякакво наблюдавано необичайно поведение (напр. избягване на почвата, липса на размножаване в изпитването за биоаккумуляция с енхитреиди),
- съотношението между сухото тепло и влажното тепло на почвата и изпитваните организми (полезно за нормализацията),
- влажното тепло на червеите по всяко време на вземане на проби; по отношение на земните червеи, влажното тепло в началото на изпитването и по всяко време на вземане на проби преди и след изхвърлянето на чревното съдържимо,
- липидно съдържание на изпитваните организми (ако е определено),

- криви, показващи кинетиката на поглъщане на изпитвания химикал и елиминирането от него в червеите, както и времето за достигане до стационарно състояние,
- $C_a$  и  $C_s$  (със стандартно отклонение и обхват, ако е уместно) за всички времена на вземане на проби ( $C_a$  изразено в  $g\ kg^{-1}$  влажно и сухо тегло от цялото тяло,  $C_s$  изразено в  $g\ kg^{-1}$  влажно и сухо тегло на почвата). Ако е необходим коефициентът на акумулация биота/почва (BSAF) (напр. за сравняване на резултатите от две или повече изпитвания, проведени с животни с различно съдържание на липиди),  $C_a$  може допълнително да се изрази като  $g\ kg^{-1}$  липидно съдържание на организма, а  $C_s$  може да се изрази като  $g\ kg^{-1}$  органичен въглерод (OC) на почвата,
- BAF (изразено в  $kg\ почва\ kg^{-1}$  червей), скорост на поглъщане в почвата (изразена в  $g\ почва\ kg^{-1}$  червей ден<sup>-1</sup>), и константа на скоростта на елиминиране (изразена в ден<sup>-1</sup>); BSAF (изразен в  $kg\ почва\ OC\ kg^{-1}$  липидно съдържание на червеите) може да се отчете допълнително,
- ако е измервано: проценти на изходния химикал, метаболити и свързани остатъчни вещества (т.е., процент от изпитвания химикал, който не може да бъде екстрахиран с помощта на обичайните методи за екстракция) открити в почвата и изпитваните животни,
- методи, използвани за статистически анализ на данните.

#### Оценка на резултатите:

- съответствие на резултатите с критериите за валидност, изброени в точка 17,
- неочаквани или необичайни резултати, напр. непълно елиминиране на изпитваните животни от изпитвания химикал.

#### ПРЕПРАТКИ:

- (1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane ( $\gamma$ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- (4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.
- (6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.
- (7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- (8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.
- (9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- (10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.



- (11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.
- (13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.
- (14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.
- (17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (ЕИО) № 793/93 на Съвета и Регламент (ЕО) № 1488/94 на Комисията, както и на Директива 76/769/ЕИО на Съвета и директиви 91/155/ЕИО, 93/67/ЕИО, 93/105/ЕО и 2000/21/ЕО на Комисията (ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1).
- (20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). *Biology and ecology of earthworms*. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.
- (21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline № 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- (22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Достъпно за копиране на следния адрес в Интернет: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- (24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

- (27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- (28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.
- (29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. *UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox.* 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225-1231.
- (31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.
- (32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-träger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.
- (36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. *Megadrilogica* 4: 6-8.
- (37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.
- (38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.
- (39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.
- (40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.
- (41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.
- (43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von <sup>14</sup>C-Hexachlorbenzol und <sup>14</sup>C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.
- (44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

- (45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.
- (46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.
- (47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log  $K_{ow}$ /log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Глава В.8 от настоящото приложение, Токсичност за земни червеи
- (49) Глава В.13 от настоящото приложение, Биоаккумуляция: проточен тест върху риби.
- (50) Глава В.21 от настоящото приложение, Почвени микроорганизми: Изпитване на азотната трансформация.
- (51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline № 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*), Test Guideline № 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline № 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- (54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.
- (57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report № 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.
- (61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W, Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

- (63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93-100.
- (66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series) № 31.* 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557-2563.
- (68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology.* S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: *Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- (77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161-165.
- (78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.
-

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Биоаккумуляция** е увеличаването на концентрацията на изпитвания химикал във или върху организъм, отнесено към концентрацията на изпитвания химикал в заобикалящата среда. Биоаккумуляцията настъпва в резултат на процесите на биоконцентрация и биомултипликация (вж. по-долу).

**Биоконцентрация** е увеличаването на концентрацията на изпитвания химикал във или върху организъм, което настъпва в резултат на поглъщане на химикала единствено от заобикалящата среда (т.е., чрез повърхността на тялото или погълнатата почва), отнесено към концентрацията на изпитвания химикал в заобикалящата среда.

**Биомултипликация** е увеличаването на концентрацията на изпитвания химикал във или върху организъм, което настъпва в резултат главно на поглъщане от замърсени храна или плячка, отнесено към концентрацията на изпитвания химикал в храната или плячката. Биомултипликацията може да доведе до пренос или акумулация на изпитвания обект в хранителните мрежи.

**Елиминиране** от изпитвания химикал е загубата на този химикал от тъканите на изпитвания организъм благодарение на активни или пасивни процеси, която се получава независимо от наличието или липсата на изпитвания обект в заобикалящата среда.

**Коефициент на биоаккумуляция (BAF)**, по всяко време на фазата на поглъщане в настоящото изпитване за акумулиране, е концентрацията на изпитвания химикал във/върху изпитвания организъм ( $C_a$  в  $g \cdot kg^{-1}$  сухо тегло на червеи), разделена на концентрацията на химикала в заобикалящата среда ( $C_s$  като  $g \cdot kg^{-1}$  сухо тегло на почвата); BAF се измерва в  $kg$  почва  $kg^{-1}$  червеи.

**Коефициент на биоаккумуляция в стационарно състояние (BCF<sub>SS</sub>)** е BAF при стационарно състояние и не се променя съществено за дълъг период от време, като концентрацията на изпитвания химикал в заобикалящата среда ( $C_s$  като  $g \cdot kg^{-1}$  сухо тегло на почвата) през този период е константа.

**Коефициентите на биоаккумуляция** се изчисляват директно от съотношението между константата на скоростта на поглъщане от почвата и константата на скоростта на елиминиране ( $k_s$  и  $k_e$ , вж. по-долу) и се наричат кинетични коефициенти на биоаккумуляция (BAF<sub>K</sub>).

**Коефициент на акумулация биота-почва (BSAF)** е нормализираната по отношение на липидите концентрация на изпитвания химикал във/върху изпитвания организъм, разделена на нормализираната по отношение на органичния въглерод концентрация на изпитвания химикал в почвата при стационарно състояние.  $C_a$  се изразява в  $g \cdot kg^{-1}$  липидно съдържание на организма, а  $C_s$  като  $g \cdot kg^{-1}$  органично съдържание на почвата; BSAF се измерва в  $kg$  органичен въглерод  $kg^{-1}$  липиди.

**Състояние на плато** или **стационарно състояние** се определя като състояние на равновесие между процесите на поглъщане и елиминиране, които протичат едновременно по време на фазата на експозиция. Стационарното състояние е достигнато в графиката на BAF като функция от времето, когато кривата стане успоредна на оста на времето и три последователни анализа на BAF върху проби, взети на интервали от най-малко два дни, не се различават с повече от 20 % един от друг, и няма статистически значима разлика между трите периода на вземане на проби. За изпитвани химикали, които се поглъщат бавно, е по-подходящо интервалите да бъдат по седем дни (49).

**Коефициент на разпределение органичен въглерод-вода ( $K_{oc}$ )** е съотношението между концентрацията на химикала във/върху съдържащата органичен въглерод част от почвата и концентрацията в равновесие на химикала във вода.

**Коефициентът на разпределение октанол-вода ( $K_{ow}$ )** е съотношението на разтворимостта на химикала в *n*-октанол и вода при равновесно състояние, изразяван също като  $P_{ow}$ . Логаритъмът от  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow}$ ) се използва като указание на потенциала на химикала за биоаккумуляция във водни организми.

**Фазата на експозиция или поглъщане** е времето, през което изпитваните организми са експонирани на изпитвания химикал.

**Константата на скоростта на поглъщане от почвата ( $k_s$ )** е числена стойност, определяща скоростта на нарастване на концентрацията на изпитвания обект във/върху изпитвания организъм, настъпваща в резултат на поглъщане от почвената фаза.  $k_s$  се изразява в  $g$  почва  $kg^{-1}$  червеи  $дни^{-1}$ .

**Фаза на елиминиране** е времето, което следва след прехвърлянето на изпитваните организми от замърсена среда в среда, несъдържаща изпитвания обект, през което време се изследва елиминирането (или нетната загуба) на химикала от изпитваните организми.

**Константата на скоростта на елиминиране ( $k_e$ )** е числена стойност, определяща скоростта на намаляване на концентрацията на изпитвания обект във/върху изпитвания организъм, настъпваща след прехвърлянето на изпитвания организъм от среда, съдържаща изпитвания обект в среда, несъдържаща изпитвания химикал.  $k_e$  се изразява в  $дни^{-1}$ .

**Изпитван химикал:** Всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

## Допълнение 2

## Изчисляване на параметрите на поглъщане и елиминиране

Основната крайна точка на изпитването за биоаккумуляция е коефициентът на биоаккумуляция, BAF. Измереният BAF може да се изчисли като се раздели концентрацията в опитния организъм,  $C_a$ , на концентрацията в почвата,  $C_s$ , при стационарно състояние. Ако по време на фазата на поглъщане не е достигнато стационарно състояние,  $BAF_K$  се изчислява въз основа на константите на скоростта, вместо въз основа на  $BAF_{ss}$ . Следва обаче да се отбележи дали BAF се основава на концентрациите при стационарно състояние, или не.

Обичайният начин за получаване на кинетичния коефициент на биоаккумуляция ( $BAF_K$ ), константата на скоростта на поглъщане от почвата ( $k_s$ ) и константата на скоростта на елиминиране ( $k_e$ ), е да се използват компютърни нелинейни методи за оценка на параметрите, например, въз основа на моделите, описани в (68). При зададен набор от последователни данни за концентрацията като функция от времето и уравненията, описващи модела:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[уравнение 1]}$$

или

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad \text{[уравнение 2]}$$

където

$C_a$  = концентрация на химикала в червеи [ $g \text{ kg}^{-1}$  влажно или сухо тегло]

$k_s$  = константа на скоростта на поглъщане в тъкани [ $g \text{ почва kg}^{-1}$  червеи ден $^{-1}$ ]

$C_s$  = концентрация на химикала в почва [ $g \text{ kg}^{-1}$  влажно или сухо тегло]

$k_e$  = константата на скоростта на елиминиране [дни $^{-1}$ ]

$t_c$  = време в края на фазата на поглъщане,

тези компютърни програми изчисляват стойности за  $BAF_K$ ,  $k_s$  и  $k_e$ .

Когато фоновата концентрация на неекспонирани червеи, например в ден 0, значително се различава от нула (както може да бъде при металите), тази фоновата концентрация ( $C_{a,0}$ ) следва да бъде включена в уравненията, така че те да приемат вида:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[уравнение 3]}$$

и

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad \text{[уравнение 4]}$$

В случаите, когато се наблюдава значително намаляване на концентрацията на изпитвания химикал в почвата във времето през фазата на поглъщане, могат да се използват следните модели, напр. (67) (79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad \text{[уравнение 5]}$$

където

$C_s$  = концентрация на химикала в почвата [ $g \text{ kg}^{-1}$  влажно или сухо тегло]

$k_0$  = константата на скоростта на разграждане в почвата [дни $^{-1}$ ]

$C_0$  = начална концентрация на химикала в почвата [ $g \text{ kg}^{-1}$  влажно или сухо тегло]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[уравнение 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{k t} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad \text{[уравнение 7]}$$

където

$C_a$  = концентрация на химикала в червеи [g kg<sup>-1</sup> влажно или сухо тегло]

$k_s$  = константа на скоростта на поглъщане в тъкани [g почва kg<sup>-1</sup> червеи дни<sup>-1</sup>]

$k_0$  = константата на скоростта на разграждане [дни<sup>-1</sup>]

$k_e$  = константата на скоростта на елиминиране [дни<sup>-1</sup>]

$t_c$  = време в края на фазата на поглъщане.

Когато е достигнато стационарно състояние по време на фазата на поглъщане (т.е.,  $t = \infty$ ), уравнение 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[уравнение 1]}$$

се свежда до:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

или до

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad \text{[уравнение 8]}$$

Тогава  $k_s/k_e \times C_s$  е приближение на концентрацията на изпитвания обект в тъканите на червеите при стационарно състояние ( $C_{a,ss}$ ).

Коефициентът на акумулация биота-почва (BSAF) може да се изчисли, както следва:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad \text{[уравнение 9]}$$

където  $f_{oc}$  е частта органичен въглерод в почвата, а  $f_{lip}$  е частта липиди в червеите, като за предпочитане и двете стойности се определят върху проби, взети от изпитването, и се базират съответно или на сухото, или на влажното тегло.

Кинетиката на елиминирането може да се моделира, като се използват данни от фазата на елиминиране и като се приложи следното уравнение, описващо модела, както и нелинеен компютърен метод за оценка на параметрите. Ако графиката на данните като функция от времето сочи постоянно експоненциално намаляване на концентрацията на изпитвания обект в животните, за описание на развитието на елиминирането във времето може да се използва еднокамерен модел (уравнение 9):

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad \text{[уравнение 10]}$$

Процесът на елиминиране понякога изглежда двуфазов, с бързо намаляване на  $C_a$  през началните фази, което, в късните фази на елиминирането, се променя към по-бавно елиминиране от изпитвани обекти, напр. (27) (68). Двете фази могат да се тълкуват чрез предположението, че в организма има две камери, от които изпитваният химикал се елиминира с различна скорост. В такива случаи следва да се проучи специализираната литература, напр. (38) (39) (40) (78).

Като се използват уравненията на модела, посочени по-горе, могат наведнъж да се изчислят кинетичните параметри ( $k_s$  и  $k_e$ ), като се приложи кинетичен модел от първи порядък едновременно към всички данни — към тези от фазата на поглъщане и към тези от фазата на елиминиране. За описание на метод, позволяващ подобно комбинирано изчисляване на константите на скоростта на поглъщане и елиминиране може да се консултират източниците (41), (73) и (70).

$$C_a = \left[ \frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[ \frac{K_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \times (m = 2) \right] \quad \text{[уравнение 11]}$$

**Забележка:** Когато параметрите за поглъщането и елиминирането се оценяват едновременно въз основа на комбинираните данни за поглъщането и елиминирането, „m“, фигуриращо в уравнение 11, е дескриптор, който позволява на компютърната програма да приписва на членовете на уравнението набори от данни за съответната фаза и да извършва коректно оценката ( $m = 1$  за фазата на поглъщане;  $m = 2$  за фазата на елиминиране).

Въпреки това, тези уравнения, описващи модела, следва да се използват внимателно, по-специално когато по време на изпитването се променя бионаличността на изпитвания химикал или когато по време на изпитването настъпва (био)разграждане (вж. напр. (79)).

## Допълнение 3

## ПРИМЕРИ ЗА ГРАФИЦИ НА ИЗПИТВАНИЯ ЗА БИОАКУМУЛАЦИЯ В ПОЧВАТА

## Изпитване със земни червеи

а) Фаза на поглъщане с 8 дати за вземане на проби, използвани за изчисляване на кинетичните параметри

Ден	Дейност
- 6	Подготвяне на приготвената почва за 48 h
- 4	Добавяне на разтвор на изпитвания химикал в част от почвата; изпаряване на разтворителя, ако има такъв; смесване на съставките на почвата; разпределяне на почвата по съдовете за изпитване; уравнивяване при условията на изпитването в продължение на 4 дни (3 седмици при почва с добавен метал).
- 3 — - 1	Отделяне на изпитваните организми от средата за отглеждане за аклиматизиране; приготвяне и овлажняване на съставките на почвата.
0	Измерване на температура и рН на почвата; вземане на проби почва от третираните съдове и съдовете за контрол на разтворителя за определяне на концентрацията на изпитвания химикал; добавяне на дажбата храна; претегляне и разпределение на червеите в изпитвателните съдове на случаен принцип; отделяне на достатъчно по-малки проби червеи за определяне на стойностите на аналитичния фон, на сухото и влажното тегло и на съдържанието на липиди; претегляне на всички изпитвателни съдове за проверка на влажността на почвата; проверка на подаването на въздух, ако се използва затворена система.
1	Проверка на подаването на въздух, записване на поведението на червеите и на стойността на температурата; вземане на проби почва и червеи за определяне на концентрацията на изпитвания обект.
2	Същото като ден 1.
3	Проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите и на стойността на температурата.
4	Същото като ден 1.
5 – 6	Същото като ден 3.
7	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
8 – 9	Същото като ден 3.
10	Същото като ден 1.
11 – 13	Същото като ден 3.
14	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
15 – 16	Същото като ден 3.
17	Същото като ден 1.
18 – 20	Същото като ден 3.
21	Същото като ден 1; измерване на температура и рН на почвата; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове; край на фазата на поглъщане; прехвърляне на червеите от оставащите подложени на експозиция повторения в съдове с чиста почва за фазата на елиминиране (без изхвърляне на чревното съдържимо); вземане на проби от почва и червеи от съдовете за контрол на разтворителя.
	Дейностите във връзка с предекспозицията (фаза на уравнивяване) следва да се планират, като се вземат предвид свойствата на изпитвания химикал.
	Дейностите, описани за ден 3, следва да се извършват ежедневно (най-малкото в работни дни).



## б) Фаза на елиминиране

Ден	Дейност
- 6	Приготвяне и овлажняване на съставките на почвата; подготвяне на приготвената почва в продължение на 48 h.
- 4	Смесване на съставките на почвата; разпределяне на почвата по изпитвателните съдове; инкубиране при условията на изпитването в продължение на 4 дни.
0 (край на фазата на поглъщане)	Измерване на температура и рН на почвата; претегляне и разпределение на червеите в изпитвателните съдове на случаен принцип; добавяне на дажбата храна; прехвърляне на червеите от оставащите подложени на експозиция повторения в съдове с чиста почва; вземане на проби почва и червеи след 4—6 часа за определяне на концентрация на изпитвания химикал.
1	Проверка на подаването на въздух, записване на поведението на червеите и на стойността на температурата; вземане на проби почва и червеи за определяне на концентрация на изпитвания химикал.
2	Същото като ден 1.
3	Проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите и на стойността на температурата.
4	Същото като ден 1.
5 - 6	Същото като ден 3.
7	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
8 - 9	Същото като ден 3.
10	Същото като ден 1.
11 - 13	Същото като ден 3.
14	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
15 - 16	Същото като ден 3.
17	Същото като ден 1.
18 - 20	Същото като ден 3.
21	Същото като ден 1; измерване на температура и рН на почвата; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове; вземане на проби от почва и червеи от съдовете за контрол на разтворителя.
	Приготвянето на почвата преди началото на фазата на елиминиране се извършва по същия начин, по който се извършва преди фазата на поглъщане.
	Дейностите, описани за ден 3, следва да се извършват ежедневно (най-малкото в работни дни).

**Изпитване с енхитреиди**

## а) Фаза на поглъщане с 8 дати за вземане на проби, използвани за изчисляване на кинетичните параметри

Ден	Дейност
- 6	Подготвяне на приготвената почва в продължение на 48 h.
- 4	Добавяне на разтвор на изпитвания химикал в част от почвата; изпаряване на разтворителя, ако има такъв; смесване на съставките на почвата; разпределяне на почвата по изпитвателните съдове; уравновесяване при условията на изпитването в продължение на 4 дни (3 седмици при почва с добавен метал).

Ден	Дейност
- 3 — - 1	Отделяне на опитните организми от средата за отглеждане за аклиматизиране; приготвяне и овлажняване на съставките на почвата.
0	Измерване на температура и рН на почвата; вземане на проби почва от третираните съдове и съдовете за контрол на разтворителя за определяне на концентрацията на изпитвания химикал; добавяне на дажбата храна към почвата; претегляне и разпределение на червеите в изпитвателните съдове на случаен принцип; отделяне на достатъчно по-малки проби червеи за определяне на стойностите на аналитичния фон, на сухото и влажното тегло и на съдържанието на липиди; претегляне на всички изпитвателни съдове за контрол на влажността на почвата; проверка на подаването на въздух, ако се използва затворена система.
1	Проверка на подаването на въздух, записване на поведението на червеите и на стойността на температурата; вземане на проби почва и червеи за определяне на концентрацията на изпитвания обект.
2	Същото като ден 1.
3	Проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите и на стойността на температурата.
4	Същото като ден 1.
5 – 6	Същото като ден 3.
7	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна към почвата; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
9	Същото като ден 1.
10	Същото като ден 3.
11	Същото като ден 1.
12 – 13	Същото като ден 3.
14	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна към почвата; измерване на температурата и рН на почвата; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове; край на фазата на поглъщане; прехвърляне на червеите от оставащите подложени на експозиция повторения в съдове с чиста почва за фазата на елиминиране (без изхвърляне на чревното съдържимо); вземане на проби от почва и червеи от съдовете за контрол на разтворителя.
	Дейностите във връзка с предекспозицията (фаза на уравнивяване) следва да се планират, като се вземат предвид свойствата на изпитвания химикал.
	Дейностите, описани за ден 3, следва да се извършват ежедневно (най-малкото в работни дни).

## Допълнение 4

**Изкуствена почва — препоръки за прогответяне и съхранение**

Тъй като естествените почви от конкретен източник могат да не бъдат достъпни през цялата година, а съдържащите се в тях организми, както и наличието на микроразмърсителни, могат да повлияят на изпитването, за употреба в настоящото изпитване се препоръчва изкуствен субстрат — изкуствената почва, приготвена съгласно глава В.8 от настоящото приложение „Токсичност за земни червеи“ (48). В нея могат да живеят, растат и се размножават редица видове, а освен това се осигуряват максимална стандартизация и вътрешнолабораторна и междулабораторна съпоставимост на условията на изпитване и отглеждане.

## Съставки на почвата

Торф	10 %	Торфен мъх в съответствие с Насоки на ОИСП 207 (48).
Кварцов пясък	70 %	Промислен кварцов пясък (изсушен на въздух); размер на зърната: > 50 % от частиците следва да бъдат в интервала 50—200 µm, но всички частици трябва да бъдат ≤ 2 mm.
Каолин	20 %	Съдържание на каолинит ≥ 30 %.
Калциев карбонат	≤ 1 %	CaCO <sub>3</sub> на прах, химически чист.

Възможно е също съдържанието на органичен въглерод на изкуствената почва да бъде намалено, напр. чрез понижаване на съдържанието на торф до 4—5 % от сухата почва, и съответно да се повиши съдържанието на пясък. С подобно намаляване на съдържанието на органичен въглерод може да се намали и способността за адсорбция на изпитвания химикал в почвата (органичен въглерод), и да се увеличи наличният изпитван химикал за червеите (74). Беше показано, че *Enchytraeus albidus* и *Eisenia fetida* могат да изпълнят критериите за валидност по отношение на възпроизводството, когато се изпитват в естествени почви с по-ниско съдържание на органичен въглерод, напр. 2,7 % (33), (61), като беше експериментално установено, че това може да се постигне и в изкуствена почва със съдържание на торф 5 %.

**Пригответяне**

Сухите съставки на почвата се смесват старателно (напр. в голямо лабораторно устройство за смесване). Това следва да се извърши около една седмица преди началото на изпитването. Смесените сухи съставки на почвата се навлажняват с дейонизирана вода най-малко 48 h преди прилагането на изпитвания обект, за да се уравни/стабилизира киселинността. За определяне на рН се използва смес от почва и разтвор на 1 M KCl в съотношение 1:5. Ако стойността на рН не е в желаната интервал (6,0 ± 0,5), в почвата се добавя достатъчно количество CaCO<sub>3</sub>, или се приготвя нова партида почва.

Максималната способност за задържане на вода (СЗВ) на изкуствената почва се определя в съответствие с ISO 11268-2 (35). Най-малко два дни преди началото на изпитването сухата изкуствена почва се навлажнява чрез добавяне на дейонизирана или възстановена вода, за получаване на приблизително половината от крайната влажност. Крайната влажност следва да бъде 40—60 % от максималната СЗВ. В началото на изпитването предварително навлажнената почва се разделя на толкова партиди, колкото са използваните в изпитването концентрации и контроли, и влажността се коригира до 40—60 % от максималната СЗВ, като се използва разтвор на изпитвания обект и/или като се добавя дейонизирана или възстановена вода. Съдържанието на влага се измерва в началото и в края на изпитването (при 105 °C). То трябва да е оптимално по отношение на изискванията на съответния вид (съдържанието на влага може също да се провери по следния начин: когато малко количество почва се стисне леко в ръка, трябва между пръстите да се появят капчици вода).

**Съхранение**

Сухите съставки на изкуствената почва може да се съхраняват при стайна температура докато не бъдат използвани. Пригответената, предварително навлажнена почва може да се съхранява на студено до три дни, преди в нея да се добави изпитваният химикал; следва да се внимава да се сведе до минимум изпаряването на водата. Почва с добавен изпитван обект следва да се използва незабавно, освен ако има информация, че конкретна почва може да се съхранява, без да се наруши токсичността или бионаличността на изпитвания обект. Проби от почва с добавен химикал могат да се съхраняват докато бъдат анализирани при условията, препоръчани за конкретния изпитван обект.

## Допълнение 5

**Видове сухоземни олигохети, които се препоръчват при изпитвания за биоаккумуляция от почвата****Земни червеи**

Препоръчаните видове за изпитването са *Eisenia fetida* (Savigny 1826), принадлежащи към семейство Lumbricidae. От 1972 г. той е разделен на два подвида (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (10). Според Jaenike (36), те са истински, различни видове. *Eisenia fetida* се разпознава лесно по светлите жълти ивици между прешлените, докато *Eisenia andrei* има равномерен тъмночервен цвят. Произходът им вероятно е от района на Черно море, но днес те са разпространени в целия свят, по-специално в антропогенно изменените местообитания, като напр. купчините компост. И двата вида могат да се използват в екотоксикологични изпитвания, както и в изпитвания за биоаккумуляция.

*Eisenia fetida* и *Eisenia andrei* са достъпни в търговската мрежа, напр. като стръв за риба. В сравнение с други земни червеи от семейство Lumbricidae, те имат по-къс жизнен цикъл, като достигат зрялост в рамките на около 2—3 месеца (при стайна температура). Оптималната температура за тях е приблизително 20—24 °C. Те предпочитат сравнително влажни субстрати с почти неутрално рН и високо съдържание на органичен материал. Тъй като тези видове са били широко използвани в стандартни екотоксикологични изпитвания в продължение на около 25 години, тяхното отглеждане е добре установено (48) (77).

И двата вида могат да бъдат отглеждани върху най-различни животински отпадъци. Препоръчаната в ISO (35) среда за отглеждане е смес 50:50 от конски или говежди тор и торф. Средата трябва да има стойност на рН от около 6 до 7 (регулирана с калциев карбонат) и ниска йонна проводимост (под 6 mS/cm или концентрация на соли по-ниска от 0,5 %) и не бива да е прекомерно замърсена с амоняк или животинска урина. Може също да се използва и достъпна в търговската мрежа градинска почва, несъдържаща добавки, или изкуствена почва в съответствие с ОИСП (48), или смес от двете в съотношение 50:50. Субстратът трябва да бъде влажен, но не прекалено мокър. Подходящи са кутии за отглеждане с вместимост 10—50 литра.

За да се получат червеи със стандартна възраст и маса, най-добре е отглеждането да се започне от пашкули. За целта възрастни червеи се добавят към кутиите за отглеждане, съдържащи пресен субстрат, за да бъдат получени пашкули. Практическият опит показва, че популация с гъстота около 100 червея на kg субстрат (влажно тегло) дава добри стойности на възпроизводство. След 28 дни възрастните червеи се отстраняват. Излюпените от пашкулите земни червеи се използват за изпитване, когато достигнат до зрялост, след най-малко 2 месеца, но по-малко от 12 месеца.

Червеите от описаните по-горе видове могат да се смятат за здрави, ако се движат в субстрата, не се опитват да го напускат и се възпроизвеждат непрекъснато. Много бавното движение или жълт заден край (при *Eisenia fetida*) са указание за изтощаване на субстрата. В този случай се препоръчва приготвянето на свеж субстрат или намаляване на броя на животни в кутия.

**Допълнителна подобрена литература**

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. № 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

**Енхитреиди**

Препоръчаният за изпитването вид е *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (бял червей). *Enchytraeus albidus* е един от най-големите (до 15 mm) видове от семейство прешленести олигохети Enchytraeidae и е разпространен в цял свят, напр. (8). *Enchytraeus albidus* се среща в морски, сладководни и сухоземни местообитания, главно в разлагаща се органична материя (водорасли, компост) и рядко по ливадите (42). Широката екологична толерантност и някои морфологични изменения са белег, че във вида може да има различни породи.

*Enchytraeus albidus* е достъпен в търговската мрежа и се продава за храна за риби. Следва да се провери дали отгледаните екземпляри не са замърсени от други, обикновено по-дребни видове (60). Ако е налице заразяване, всички червеи следва да се измият с вода в стъкло на Петри. След това се избират едри възрастни екземпляри от *Enchytraeus albidus* (използва

се стереомикроскоп), за започване на нова култура. Всички други червеи се отстраняват. Живненият цикъл при този вид е къс, тъй като той достига до зрелост между 33 дни (при 18 °C) и 74 (при 12 °C). В изпитвания следва да се използват само култури, които са били държани в лаборатория в продължение на най-малко 5 седмици (едно поколение) без проблеми.

Други видове от рода *Enchytraeus* също са подходящи, по-специално *Enchytraeus luxurius*. Този вид е истински почвен обитател, който наскоро беше описан в (65). Ако се използват други видове от род *Enchytraeus*, те следва да бъдат ясно определени и да се отчетат причините за избора им.

*Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) е вид, принадлежащ към същата група, към която спада и *Enchytraeus luxurius*. Съществуването му в природата не е било установено със сигурност, видът е бил описан само в култури на червеи и в купчини компост (Römbke 2003). Поради това присъщите му изисквания по отношение на средата не са известни. Въпреки това, неотдавнашни лабораторни изследвания с разнообразни естествени почви са потвърдили, че този вид има широка толерантност към свойствата на почвата — такива като рН и текстурата (Jänsch et al., 2005). През последните години този вид често е бил използван в изследванията за екоотоксичност поради това, че лесно се поддържа на отглеждане и изпитване (напр. Kuperman et al. 2003). Независимо от това, видът е дребен (3—12 mm; средно 7 mm (Westheide & Müller 1996), което прави боравенето с него по-сложно, отколкото с *Enchytraeus albidus*. Когато този вид се използва вместо *Enchytraeus albidus*, размерът на изпитвателния съд може да е по-малък, без това да е необходимо. Освен това следва да се има предвид, че видът се възпроизвежда много бързо, времето за достигане на зрялост е по-малко от 20 дни при 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) и дори по-кратко при по-висока температура.

Енхитреидите от вида *Enchytraeus albidus* (както и други видове *Enchytraeus*) могат да бъдат развъждани в големи пластмасови кутии (напр. 30 × 60 × 10 cm, или 20 × 12 × 8 cm, които са подходящи за получаване на култура от червеи от по-малък размер), които се пълнят със смес от изкуствена почва и незамърсена градинска почва без добавки, достъпна в търговската мрежа. Употребата на компост следва да се избягва, тъй като той може да съдържа токсични химикали, като тежки метали. Преди употреба фауната следва да бъдат елиминирани от почвата за развъждане чрез трикратно дълбоко замразяване. Може също така да се използва чиста изкуствена почва, но темповете на размножаване може да се окажат по-ниски в сравнение с онези, които биха се получили при смесен субстрат. Субстратът трябва да има рН от 6,0 ± 0,5. Културата се съхранява в инкубатор при температура 15 ± 2 °C без светлина. При всички случаи температура, по-висока от 23 °C, трябва да се избягва. Изкуствената/естествената почва трябва да бъде влажна, но не мокра. При леко стискане в ръка на почвата трябва да се появяват само малки капки вода. При всички случаи, трябва да се избягва отсъствие на кислород (напр. ако се използва капак, броят на отворите в капака трябва да бъде достатъчно голям, за да осигури достатъчен обмен на въздух). Почвата за развъждане трябва да се аерира, като внимателно се размесва веднъж седмично.

Червеите следва да бъдат хранени поне веднъж седмично *ad libitum* със сплескани овесени ядки, които са поставени във вдлъбнатина на повърхността на почвата и покрити с почва. Ако храната от последното хранене остава в контейнера, количеството храна, което се дава, следва да бъде съответно коригирано. Ако по оставашата храна се появят гъбички, тя трябва да се смени с нова порция сплескани овесени ядки. С цел да се стимулира възпроизводството, сплесканите овесени ядки могат да бъдат допълвани на всеки две седмици с протеин на прах с добавка на витамини, който може да бъде намерен в търговската мрежа. След три месеца, животните трябва да бъдат прехвърлени в прясно приготвен субстрат за отглеждане или развъждане. Овесените ядки, които трябва да се съхраняват в запечатани съдове, следва да се обработват в автоклав или да се нагряват преди употреба с цел да се избегнат инфекции с брашнени акари (напр. *Gluyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) или хищни акари (напр. *Hypoaspis (cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*). След дезинфекция, храната се смилва, така че да може да бъде лесно разпръсната по повърхността на почвата. Друг възможен източник на храна е мая за хляб или храна за риби TetraMin®.

Като цяло условията за отглеждане са достатъчно добри, ако червеите не се опитват да напуснат субстрата, движат се бързо в почвата, имат лъскава външна повърхност без частици почва, прилепнали към нея, имат повече или по-малко извнен белезникав цвят, и ако се наблюдават червеи от различни възрасти. Червеите могат да се считат за здрави, ако се възпроизвеждат непрекъснато.

#### Допълнителна подобрена литература

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.